

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra experimentální biologie rostlin



Mechanismy polarizace epidermálních buněk rostlin

Mechanisms of epidermal cells polarization in plants

bakalářská práce

Zdeňka Vojtíková

Školitel: RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Praha 2010

Obsah

Obsah.....	1
Abstrakt	2
Abstract	2
Seznam použitých zkratk.....	3
1. Úvod.....	4
2. Diferenciace epidermis.....	5
2.1. Vývoj epidermis a její role v životě rostlin	5
2.2. Rozmísťování specializovaných buněk epidermis	7
2.2.1. Dlaždicové buňky	7
2.2.2. Trichomy	7
2.2.3. Průduchy.....	9
3. Asymetrický růst	15
3.1. Polarizace	15
3.2. Úloha cytoskeletu	15
3.2.1. Mikrotubuly.....	16
3.2.2. Aktinová mikrofilamenta	17
3.3. ROP GTPázy	18
3.4. Sekreční dráha	23
4. Buněčná stěna epidermis a role sekrece při formování buněčné stěny	24
4.1. Sekrece komponentů buněčné stěny.....	24
4.2. Kutikula	25
4.3. Sekrece komponentů buněčné stěny.....	33
4.4. Polarizovaná sekrece při vzniku trichomů	34
4.5. Polarizovaná sekrece při vývoji semenných obalů	35
5. Závěr.....	37
Použitá literatura	38

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením RNDr. Viktora Žárského, CSc. a souhlasím s jejím zveřejněním.

V Praze dne 13. 8. 2010

Zdeňka Vojtíková

Abstrakt

Buňky rostlinné epidermis společně vytváří kontaktní plochu rostliny a chrání ji před vlivy vnějšího prostředí a zprostředkovávají komunikaci s okolím. V epidermis je za pomoci polarizačních mechanismů rovnoměrně rozmístěno několik buněčných typů (dlaždicové buňky, trichomy a průduchy) s velice specializovanou morfologií. Svých tvarů dosáhnou díky polarizovanému růstu, který je zajištěn cytoskeletem a signalizačními molekulami z rodiny ROP GTPáz. Cytoskelet v odpovědi na signál ovlivňuje rozpínání buňky, napomáhá zacílit sekreci do míst aktivního růstu a polarizovaně zabudovávat nový materiál do buněčné stěny. Na svrchní straně epidermis se vylučuje kutikula a vrstva epikutikulárních vosků. Sekrece složek kutikulárních vrstev je baso-apikálně polarizovaná. V této práci jsou shrnuty doposud objevené mechanismy polarizace v buňkách epidermis rostlin.

Klíčová slova:

Arabidopsis thaliana, buněčná stěna, cytoskelet, dlaždicové buňky, epidermis, kutikula, polarizace, průduchy, ROP GTPázy, sekrece, trichomy

Abstract

Plant epidermal cells form contact area of the plant, they protect it from impacts of surrounding environment and they mediate the communication with its neighbourhood. In the epidermis there are evenly distributed several cell types with quite specialized morphology (pavement cells, trichomes and guard cells) due to the polarization mechanisms. The cytoskeleton and signal molecules of ROP GTPase family promote the polarized growth. Thanks to polarized growth the cells reach their shapes. The cytoskeleton responds to the signal by expanding the cell, helps with targeting of the secretion to the sites of active growth and mediates polarized formation of the cell wall. On the upper side of the epidermis the cuticle and layer of epicuticular wax is secreted. The secretion of cuticular components is baso-apically polarized. This work summarizes the mechanisms of the polarization in plant epidermal cells discovered until now.

The key words:

Arabidopsis thaliana, cell wall, cuticle, cytoskeleton, epidermis, pavement cells, polarization, ROP GTPases, secretion, stomata, trichomes

Seznam použitých zkratk

ABC - ATP binding cassette

ARP2/3 - actin-related protein 2/3

ATP - adenosintrifosfát

BASL - BREAKING OF ASYMMETRY IN THE STOMATAL LINEAGE

BDG - BODYGUARD

cer - *eceriferum*

ER - endoplazmatické retikulum

F-aktin - filamentární aktin

FLP - FOUR LIPS

GAP - GTPase-activating protein

GDI - GDP dissociation inhibitor

GDP - guanosindifosfát

GEF - guanosine exchange factor

GFP - green fluorescent protein

GL1 - GLABROUS1

GTP - guanosintrifosfát

ICR1 - INTERACTOR OF CONSTITUTIVE ACTIVE ROPs 1

LTP - lipidové transferové proteiny

MOR1 - MICROTUBULE ORGANIZATION 1

Rho GTPáza - nenašla jsem přepis zkratky

RIC - ROP ROP interacting CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding) motif containing proteins

ROP GTPáza - Rho of plants guanosin trifosfatáza

ROP2/4 - ROP2 nebo ROP4

Scar/WAVE - suppressor of cyclic AMP receptor/Wiskott-Aldrich syndrome Verprolin-homologous protein

SCN1 - SUPERCENTIPEDE1

SDD1 - STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1

SNARE - SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor

SPK1 - SPIKE1

TMM - TOO MANY MOUTHS

TRIPTYCHON - TRY

TTG - TRANSPARENT TESTA GLABRA

WBC - White-Brown Complex homolog

1. Úvod

Polarizace dává buňkám nepřeberné množství specifických tvarů, díky kterým rostlina vytváří při vývoji odlišná pletiva a různé buněčné typy. Rostlina tak i přes přisedlý způsob života může efektivně žít ve svém prostředí a těžit z něj. Na buněčnou polarizaci lze nazírat též jako na asymetrii v jejím tvaru, kdy formování asymetrie je primárně vyvoláno polarizačním signálem, který ovlivňuje prostorové rozmístění signálních molekul v buňce. Signální molekuly následně za pomoci cytoskeletu a vesikulárního transportu ustanoví a zachovají polaritu buňky. Buněčná polarizace je naprosto esenciální v každé fázi rostlinného vývoje a to již od naprostého počátku, kdy dochází k polarizaci zygoty před prvním asymetrickým dělením. Neméně důležité pro morfogenezi a diferenciaci buněk v rostlině je polarizované buněčné dělení.

Ve své práci jsem se pokusila shrnout objevené mechanismy, které vytváří polarizaci epidermálních buněk. V druhé kapitole jsem se zaměřila hlavně na polarizaci asymetrického dělení ve stomatální linii, které ustanovuje rovnoměrné rozmístění průduchů. Dále jsem ve třetí kapitole nejvíce prostoru věnovala signalizaci při planární polarizaci dlaždicových buněk a roli cytoskeletu v ní. Poslední kapitola mé práce se věnuje polarizované sekreci a především baso-apikální polarizaci dlaždicových buněk, čili sekreci kutikuly a vrstvy epikutikulárních vosků na povrch epidermis. Z důvodu rozsáhlosti tématu a omezeného prostoru této práce jsem se rozhodla vynechat rhizodermis kořenů a roli auxinu v polarizaci rostliny.

2. Diferenciace epidermis

2.1. Vývoj epidermis a její role v životě rostlin

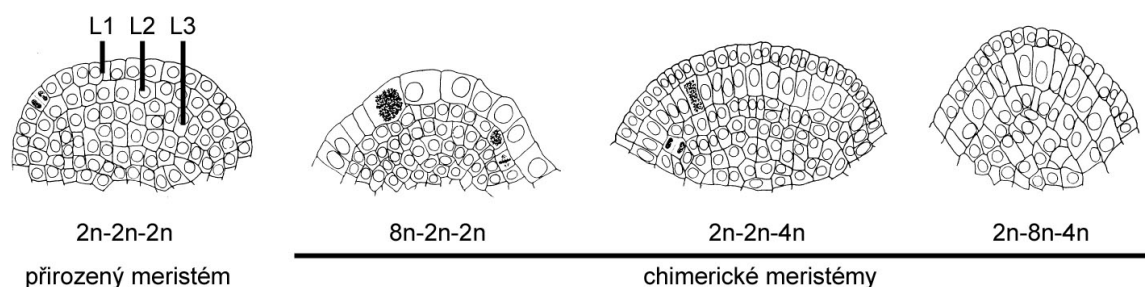
Povrch rostlinného těla je tvořen krycími pletiví, která rostlině zajišťují ochranu před vnějším prostředím, vymezují ji vůči němu a umožňují komunikaci s okolím. Primárním krycím pletivem je pokožka. Ta kryje po celý život povrch listů a orgánů od nich odvozených. Dále kryje povrch stonku a kořene, pokud druhotně netloustnou. Tehdy je epidermis porušena a substituována sekundárním krycím pletivem - peridermem. (Leyser & Day, 2003)

Nejvýznamnější funkcí epidermis je zprostředkovávání výměny plynů, tedy příjem CO_2 , O_2 a výdej vodní páry. Ochraňuje tím rostlinu před vysycháním, regulací transpirace zabraňuje přehřívání listů a umožňuje průběh fotosyntézy a dýchacích procesů. Stejně důležitá je i funkce epidermis v regulaci celkové morfogeneze rostlinných orgánů (Savaldi-Goldstein & Chory, 2008), o tomto aspektu funkce epidermis ovšem máme relativně málo znalostí. Tyto funkce plní epidermis mimo jiné díky komplikované polarizaci pokožkových buněk. Pro morfogenezi epidermálních buněk jsou důležité především dvě formy buněčné polarizace. Zaprvé polarita planární formovaná podél povrchu, která vytváří jejich charakteristický lalokovitý tvar a koordinuje vznik výběžků a vhloubenin (Fu *et al.*, 2005). A zadruhé polarita bazálně-apikální formovaná kolmo k povrchu, zajišťující sekreci na povrch buněk, tedy také např. impregnaci vnější strany epidermis kutikulárními lipidy (Suh *et al.*, 2005).

Rostlinné buňky jsou nepohyblivé a pevně spojené buněčnou stěnou. Toto omezení vyžaduje koordinaci jejich společného růstu tak, aby některé nerostly rychleji či pomaleji a nezpůsobovaly tak poruchy v pletivu. To ovšem neznamená, že by všechny buňky v rostlině rostly naprosto homogenně. Rostlinný růst je řízený, což vyžaduje mezibuněčnou komunikaci a koordinovanou proliferaci a expanzi jednotlivých buněk. U řady vyšších rostlin byly geneticky rozlišeny tři buněčné vrstvy meristémů, které dávají vzniknout všem rozdílným pletivům a orgánům rostliny (Satina *et al.*, 1940; Simon, 2001). Nejsvrchnější vrstva L1 se diferencuje v epidermis, pod kterou se z vrstvy L2 vytváří mimo jiné fotosyntetizující pletiva a v pozdějším vývoji také základy buněk pohlavního rozmnožování. Vnitřek nadzemních částí

rostliny je vyplněn pletivou vzniklými z poslední vrstvy L3. Zatímco v povrchových buněčných vrstvách L1 a L2, které dohromady tvoří tzv. tuniku rostliny, převažují dělení kolmá k povrchu vedoucí k zachování buněčné linie, vnitřní vrstva L3, tzv. korpus, se dělí všemi směry a má tak schopnost vyplnit vnitřek rostliny (Simon, 2001). Zdá se, že jedním z hlavních řídicích elementů morfogeneze rostlin je vrstva epidermis, která ovlivňuje růst a vývoj vrstev pod sebou tím, že kontroluje míru a směr jejich růstu (Green, 1980; Kutschera, 1992). Epidermis vrstvy pod sebou ovlivňuje svými mechanickými vlastnostmi, mezibuněčným transportem makromolekul a hormonálně (Savaldi-Goldstein & Chory, 2008).

Mnoho nových informací bylo získáno díky studiu periklinálních chimér. V těchto chimérách vrstvy L1 a L3 fungují normálně, syntetizují chlorofyl a mají zelenou barvu, zatímco vrstva L2 ztratila schopnost syntetizovat chlorofyl a její buňky jsou tedy bílé. Jejich studium prokázalo, že osud buňky není určen její buněčnou linií, nýbrž pozicí (Szymkowiak & Sussex, 1996). Například některé buňky ze spodního okraje vrstvy L2 se periklinálním dělením mohou dostat hlouběji a ocitnout se ve vrstvě L3, kde přeberou osud buněk z této vrstvy. Tyto buněčné „invaze“ jsou vzácné, ale možné a mohly by pozměnit normální morfologii listu tím, že v nějaké vrstvě bude nepřiměřeně větší množství buněk nežli ve vrstvě sousední. Z tohoto důvodu má buňka koordinační a signální mechanismy, kterými v rámci vrstev a mezi nimi omezí dělení tak, aby normální morfologii listu. Efektivnost s jakou rostlina dokáže vývoj vrstev L1, L2 a L3 řídit je obdivuhodná. Lze to dobře demonstrovat na chimérách s pozměněnou ploidií jednotlivých vrstev. Stejně jako u jiných eukaryot velikost buňky v rostlinách proporcčně odpovídá její ploidii. Chiméra s upravenou ploidií, například s oktoploidní vrstvou L1 a diploidními vrstvami L2 a L3, dokáže zkoordinovat dělení vrstvy L1 tak, aby kompenzovala velikost oktoploidních buněk jejich počtem a zachovala si normální morfologii (Satina et al., 1940; Satina et al., 1946).



Obr. 1: Koordinace růstu mezi vrstvami chimérických meristémů. Různé varianty oktoploidních a diploidních chimér. Podle Satina et al. (1940) a Leyser & Day (2003).

2.2. Rozmíst'ování specializovaných buněk epidermis

Epidermis je většinou jednovrstevná a složená z více typů buněk. Nejvíce jsou v ní zastoupeny základní pokožkové buňky - dlaždicové buňky, mezi kterými jsou rozmístěny buňky od nich odvozené - trichomy, svěrací buňky průduchů apod. (Guimil & Dunand, 2007). Epidermis tvoří buňky s extrémně rozdílným tvarem a funkcí, jejich buněčná morfogeneze je nesmírně komplexní a dynamická. Najednou se jí účastní několik buněčných procesů (Guimil & Dunand, 2007). Konečný tvar a velikost buněk je tak rozhodující pro funkci rostlinných orgánů. Neméně důležité je i rozmístění jednotlivých typů epidermálních buněk. Mezi základními dlaždicovými buňkami jsou pravidelně uspořádány trichomy a na spodní straně listu ještě svěrací buňky průduchů. K vytvoření správného uspořádání buněk má rostlina několik mechanismů.

2.2.1. Dlaždicové buňky

Jejich primární funkcí je chránit buněčné vrstvy pod epidermis (Ramsay & Glover, 2005). Jsou to nejhojnější buňky pokožky, jsou ploché, odtud název dlaždicové, a dokonale k sobě přiléhají bez mezibuněčných prostor (Panteris *et al.*, 1994). Z epidermálních buněk jsou dlaždicové buňky největší. Velikost je u nich regulována procesem endoreduplikace a zvyšováním ploidie buněk, která se pohybuje mezi 2C a 16C (Melaragno *et al.*, 1993). Vytvářejí laloky (výběžky) a krčky (oblasti vchlípenin) (Fu *et al.*, 2005). Jednotlivé laloky a vchlípeniny do sebe navzájem perfektně zapadají jako skládačka puzzle. Dlaždicové buňky většinou neobsahují chloroplasty a neprodukují chlorofyl, epidermis je tak průsvitná. Mívají velkou vakuolu s flavonoidy, které ochraňují vnitřní vrstvy před UV zářením (Fu *et al.*, 2005). Svou propustnost pro vodu pokožkové buňky snižují ztloustitím vnější buněčné stěny a její impregnací hydrofóbním kutinem a vosky (Pighin *et al.*, 2004). Kutin se zabudovává do svrchních vrstev buněčné stěny a dále na povrchu tvoří samostatnou vrstvu - kutikulu. Nad ní se mohou ještě ukládat epikutikulární vosky.

2.2.2. Trichomy

V epidermis mnoha rostlin se vyskytují rozmanité druhy chlupů - trichomů. Trichomy nefotosyntetizují, chrání rostlinu před herbivory, UV zářením a ztrátami vody (Liakoura *et al.*, 1997; Tingey, 1991). Studium *Arabidopsis thaliana* naznačuje, že v čeledi Brassicaceae jsou mnohobuněčné trichomy evolučně starší a jednobuněčné se z nich vyvinuly potlačením

buněčných dělení (Beilstein *et al.* 2006). Trichomy vícebuněčné vznikají po několikanásobném dělení pokožkové buňky, zatímco trichomy jednobuněčné jsou spojeny s procesem endoreduplikace (Schnittger & Hulskamp, 2002). Tak je tomu u trichomů *Arabidopsis thaliana*, o nichž bude pojednáno dále. Trichomové iniciály nepodstoupí mitotické dělení, nýbrž přepnou na proces replikace bez buněčného dělení (endoreduplikace). Objem buňky narůstá a případně po čtyřech cyklech dosáhne buňka obsahu DNA až 32C (Schnittger & Hulskamp, 2002). Při růstu a vývoji trichomu následuje většinou několik větvení, nejčastěji tři až čtyři. Úhly mezi vzniklými větvemi jsou pravidelné, stejně tak rozestupy mezi jednotlivými trichomy na listu (Schnittger & Hulskamp, 2002). Existuje korelace mezi počtem větvení a ploidií trichomové buňky. Mutanti s menším obsahem DNA mají méně větví, zatímco mutanti se zvýšenou ploidií mají větví více (Folkers *et al.*, 1997). Dalším významným regulátorem větvení, jsou mikrotubuly (Mathur & Chua, 2000). Aktinový cytoskelet je důležitý v momentě, kdy je ukončeno větvení a nastává prodlužování jednotlivých větví (Schellmann & Hulskamp, 2005).

Uspořádání trichomů na ploše listu je poměrně pravidelné a trichomy rovnoměrně pokrývají celou plochu listu s přibližně stejnými rozestupy mezi sebou. Začínají se diferencovat v časně fázi vývoje listu, kdy se okolní buňky ještě dělí. V této době vznikají první trichomy, které se od sebe následně vzdalují, jak se listová plocha zvětšuje. Ve vzniklých mezerách mezi nimi pak vznikají další trichomy. Epidermální buňky v okolí dospělého trichomu se zvětší a vytvoří skupinu podpůrných buněk trichomu. Iniciaci trichomu zajišťují geny *GLABROUS (GL1)* a *TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG)* jejichž mutantní rostliny trichomy postrádají (Larkin *et al.*, 1994). *GL1* řídí vstup epidermální buňky do diferenciačního programu vedoucího ke vzniku trichomu, přičemž je důležitý jak ve fázi iniciace, tak i následné inhibice v okolních buňkách. Jeho nízká exprese ve všech epidermálních buňkách a vysoká exprese v trichomech naznačuje, že právě navýšení exprese *GL1* je signálem k zahájení diferenciace trichomu (Larkin *et al.*, 1994). Uspořádání trichomů na listu je dosaženo elegantním mechanismem mezibuněčné signalizace dvou zpětnovazebných smyček. V rámci buňky se odehrává první smyčka, kdy exprese *GL1* a *TTG* autokatalyticky zvyšuje jejich vlastní expresi a po dosažení potřebné hodnoty se zahájí diferenciace trichomu. Druhá zpětnovazebná smyčka inhibitoru zabraňuje tomu, aby se ze všech epidermálních buněk časem nestaly trichomy. Jako inhibitor zde vystupuje gen

TRIPTYCHON (*TRY*), který zabraňuje shlukování trichomů (Schnittger *et al.*, 1998). Expresi *GL1* a *TTG* podporuje v buňkách expresi *TRY* a *TRY* redukuje expresi *GL1* a *TTG* v sousedních buňkách (Schnittger *et al.*, 1998). Buňky, které se diferencovaly v trichom pomocí *TRY*, tudíž ve svém okolí zamezí vzniku dalšího trichomu. Ten se může vytvořit až v dostatečné vzdálenosti, kde je exprese *TRY* natolik slabá, že nepotlačí expresi *GL1* a *TTG*.

2.2.3. Průduchy

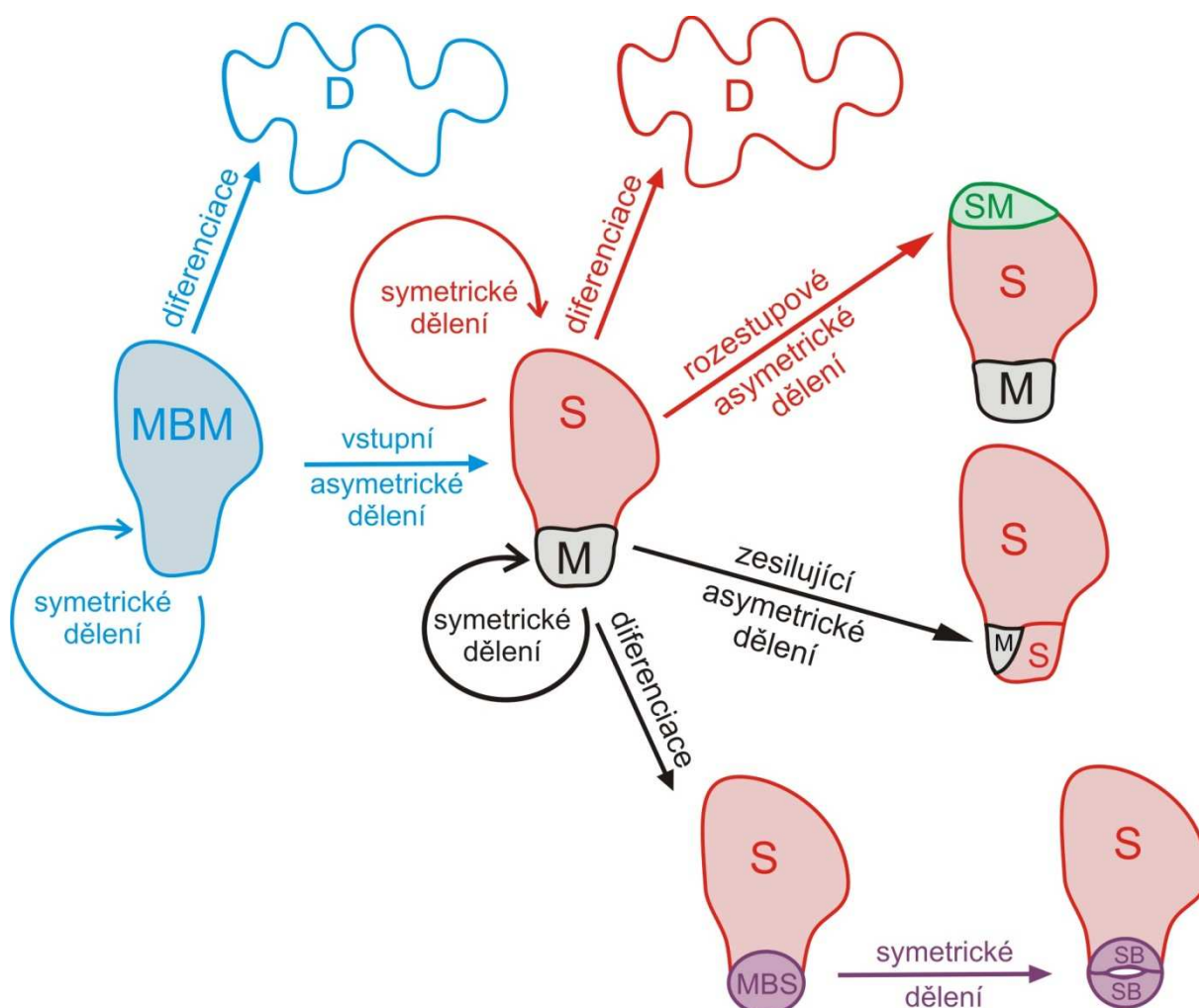
Tvar svěřacích buněk průduchů je značně specifický. Vnitřní stěna svěřací buňky je zesílená oproti vnější stěně, čímž buňka získává charakteristický ledvinovitý tvar. Zároveň jsou to jediné buňky epidermis, které produkují chlorofyl. Skrz průduchy rostlina získává kyslík a zbavuje se oxidu uhličitého a vodní páry. Pro produktivitu rostliny jsou průduchy a jejich správná regulace naprosto rozhodující. Vyváženou a efektivní výměnu plynů bez zbytečných ztrát vody rostlina reguluje uzavíráním a otvíráním průduchů dle aktuální potřeby (Santrucek *et al.*, 2007). Ve chvíli, kdy se ve svěřací buňce zvýší turgor, vnější zesílená stěna se roztáhne do šířky a vnitřní stěnu stáhne s sebou. Tím se průduch otevře. Rostlina výměnu plynů s okolním prostředím ovšem ovlivňuje již na počátku svého vývoje správným formováním a rozmístěním průduchů a jejich vhodnou hustotou (Santrucek *et al.*, 2007).

Ke správnému uspořádání pokožkových buněk rostlina používá komplikovaný vývojový mechanismus, ve kterém mají velký význam posloupnost v buněčné linii a asymetrická dělení, signály mezi sousedními buňkami a také signalizace na větší vzdálenosti (Geisler *et al.*, 2000). Mechanismus asymetrického dělení se při vývoji organismu hojně využívá. U rostlin se asymetrické dělení vztahuje k časnému vývoji embrya, k vytváření vrstev tkání (např. kortex a endodermis kořene) a ke generování diverzity buněčných typů a jejich rozmístění během postembryonálního vývoje (ten Hove & Heidstra, 2008). Zatím byly objeveny některé geny a signály z buněk epidermis a mezofylu, které uspořádání průduchů ovlivňují (Geisler *et al.*, 2000). Je zajímavé zkoumat, jak regulují buněčnou polaritu, buněčný cyklus a osud buňky. Rozmístění a vytváření průduchů je určeno řadou posloupných asymetrických buněčných dělení, která mimo jiné zajistí, že se nikdy nenachází dva průduchy přímo u sebe (Geisler *et al.*, 2000). Asymetrickým dělením dá buňka vzniknout dceřiným buňkám, které se odlišují velikostí, tvarem či buněčným obsahem. Mezibuněčné signály v takové situaci ovlivňují rovinu asymetrického dělení a počet dělení, a tím i počet průduchů

(Nadeau & Sack, 2003). Signální kaskáda zprostředkovaná receptorem na buněčném povrchu, která je zodpovědná za utváření uspořádání, je tvořena geny *TOO MANY MOUTHS (TMM)* a *STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION1 (SDD1)* (Nadeau & Sack, 2003).

Prvními prekuzory svěracích buněk průduchů ve stomatální buněčné linii jsou kmenové buňky této linie, které dávají vzniknout tzv. mateřské buňce meristemoidu (Geisler *et al.*, 2000). Ta se může buď diferencovat v buňku dlaždicovou, nebo se symetricky dělit a obnovovat tak zdroj dalších mateřských buněk meristemoidů, nebo se může až třikrát asymetricky rozdělit (Nadeau & Sack, 2002). Tímto „vstupním“ asymetrickým dělením vznikne vždy jedna buňka dceřiná, tzv. meristemoid, která je menší a zachovává si vlastnosti mateřské buňky meristemoidu, a dále jedna buňka sesterská, sousední, která je větší (Nadeau & Sack, 2002). Nově vzniklý meristemoid ať primární, či sekundární, může podstoupit druhé („zesilující“) asymetrické dělení a tím zvyšovat počty buněk, nebo se diferencovat v mateřskou buňku svěrací (Nadeau & Sack, 2002). Ta následně podstoupí jedno symetrické dělení a vytvoří pár svěracích buněk průduchu (Geisler *et al.*, 2000j). Toto symetrické dělení je limitováno genem *FOUR LIPS (FLP)* tak, aby k němu došlo jen jednou (Lai *et al.*, 2005). U ztrátových mutantů *Arabidopsis flp* dochází k vícenásobnému dělení mateřských buněk svěracích a vytváří se tak zvláštní shluky svěracích buněk (Lai *et al.*, 2005). Třetí asymetrické dělení („rozestupové“) zajišťuje, že se nevytvoří dva průduchy vedle sebe. Dochází k němu v buňce sesterské (Geisler *et al.*, 2000). Ta se může rozdělit symetricky či se diferencovat v buňku dlaždicovou, anebo se může rozdělit právě asymetricky a vytvořit tzv. sekundární (satelitní) meristemoid a novou sesterskou sousední buňku (Geisler *et al.*, 2003). K rozestupovému asymetrickému dělení dochází v sesterských sousedních buňkách, které se nacházejí vedle průduchu či jednoho z jeho prekuzorů (mateřská buňka meristemoidu, meristemoid). Proto se (mimo jiné pomocí mezibuněčných signálů) ustanoví rovina dělení v satelitním meristemoidu tak, aby byl nově vzniklý prekuzor průduchu na odvrácené straně a nikoli v kontaktu s již existujícím či potenciálním průduchem (Geisler *et al.*, 2003). Tyto mezibuněčné signály vysílají svěrací buňky průduchů a jejich prekuzory ke svým sousedním buňkám. První druh signálu je vyslán buňkám, které sousedí jen s jednou svěrací buňkou, nebo buňkou, která má potenciál svěrací buňkou se stát (Geisler *et al.*, 2000). Tento signál je instruuje právě k tomu, aby orientovaly své rozestupové asymetrické dělení tak, že menší dceřiná buňka, která povede ke vzniku nových svěracích buněk, má být orientována směrem

prýč od již se utvářejícího průduchu (Geisler *et al.*, 2000g). Druhý typ signálu se vysílá k buňkám, které sousedí se dvěma nebo i více existujícími či potenciálními průduchy (Geisler *et al.*, 2003c). Takovýmto buňkám je v dělení zamezeno (Geisler *et al.*, 2000f). Každé asymetrické dělení dává vzniknout jedné sesterské buňce, čímž se neustále navyšuje počet nestomatálních buněk epidermis. Stomatální buněčná linie produkuje přibližně 48 % všech dlaždicových buněk listu a celkový počet buněk listu *Arabidopsis* je z 30 % tvořen svěracími buňkami průduchů, takže stomatální buněčná linie produkuje kolem 80 % epidermálních buněk (Geisler *et al.*, 2000e). Z těchto čísel vyplývá, jak významný je tento systém při výstavbě epidermis listu.



Obr. 2: Posoupnost buněčných dělení ve stomatální linii. MBM (modrá) - mateřská buňka meristemoidu; M (černá) - meristemoid; S (červená) - sesterská buňka; MBS (fialová) - mateřská buňka svěrací, SB (fialová) - svěrací buňka; D - dlaždicová buňka; SM (zelená) - sekundární meristemoid

Prvními odhalenými články mechanismu rozmísťování průduchů jsou geny *TMM* a *SDD1*. Mutace *tmm* narušuje správnou orientaci roviny asymetrického dělení a mění počty asymetrických dělení sesterských buněk (Geisler *et al.*, 2003; Geisler *et al.*, 2000). Následkem těchto pozměněných pravidel dělení v rámci stomatální linie u mutantních rostlin je vytváření kontaktních průduchů, protože jejich prekuzory mohly vzniknout v sousedství jiných prekuzorů či průduchů (Geisler *et al.*, 2000). Protein TMM tedy řídí orientaci roviny asymetrického dělení, která je důležitým faktorem utváření uspořádání průduchů a reguluje počet těchto dělení (Geisler *et al.*, 2000). Fenotypy mutantů *sdd1* a *tmm* jsou si podobné v tom, že u obou dochází k navýšení počtu průduchů. Oba proteiny tím pádem působí jako negativní regulátory asymetrického dělení v sousedních buňkách průduchů či jejich prekuzorů (Berger & Altmann, 2000). Protein SDD1 se zdá být důležitější pro řízení hustoty průduchů a protein TMM se zdá být významný hlavně pro jejich prostorové uspořádání.

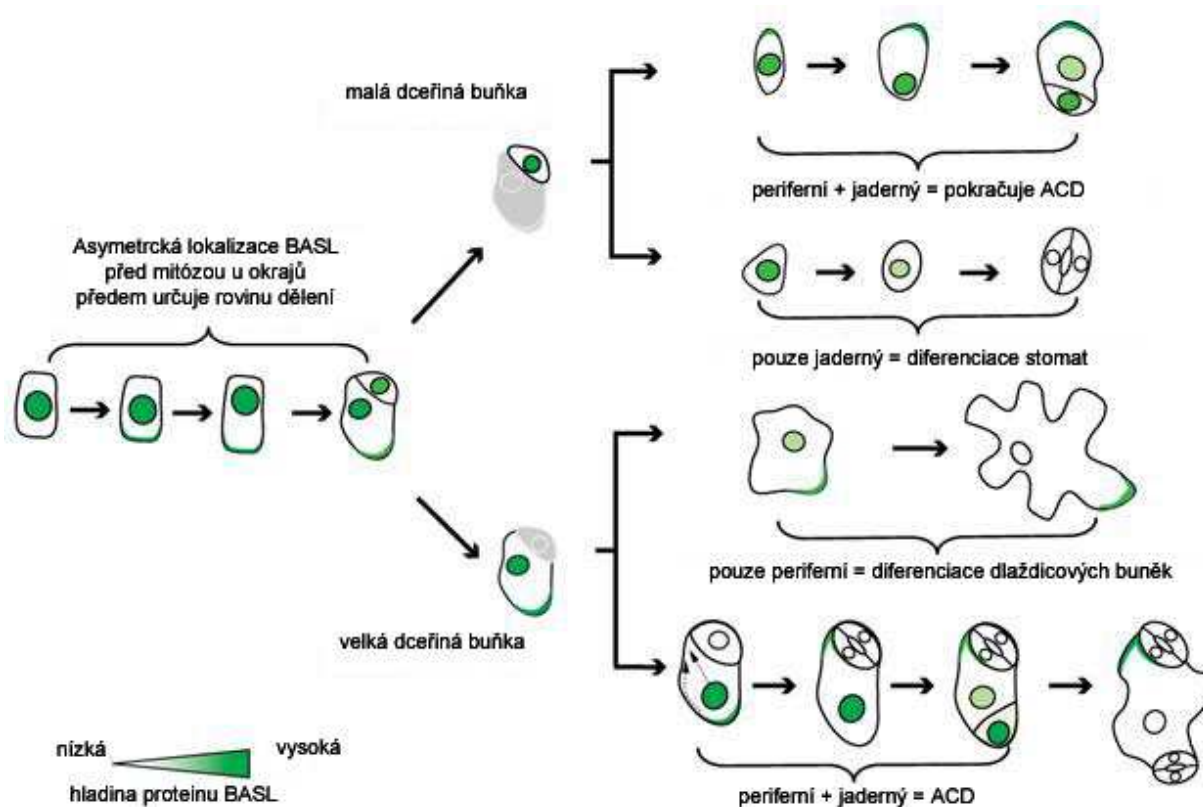
Gen SDD1 kóduje subtilisinu podobnou serinovou proteázu (Berger & Altmann, 2000). Stejně jako podobné proteázy se bude pravděpodobně signalizace účastnit skrze modifikaci signálu, např. štěpením prekuzorů peptidových mezibuněčných signálů. Narozdíl od *TMM* je exprimován pouze v buňkách prekuzorů průduchů, nikoli v jejich sousedních sesterských buňkách (Berger & Altmann, 2000) (*TMM* je exprimován jak v prekuzorech, tak v sousedních buňkách). Zdá se, že SDD1 vytváří či aktivuje extracelulární signál, a naopak TMM přijímá poziční signál (Serna & Fenoll, 2002). To vede ke spekulacím o propojenosti těchto dvou genů v rámci jedné signalizační kaskády, které však nejsou dále mechanisticky potvrzeny (Serna & Fenoll, 2002).

Rovina dělení a místo tvorby nové buněčné stěny jsou určeny pozicí preprofázního svazku mikrotubulů při mitóze (Lucas *et al.*, 2006). Správné nastavení roviny asymetrického dělení v buňkách sousedících s průduchy či jejich prekuzory zajistí, že nebudou vznikat průduchy v těsném kontaktu. Dospělý průduch i jeho dva prekuzory musí nějak ovlivnit své sousední buňky a signalizace je tedy velmi pravděpodobně zaměřena právě sem.

Nedávno objevený regulační protein asymetrického dělení u *Arabidopsis thaliana* BASL (*BREAKING OF ASYMMETRY IN THE STOMATAL LINEAGE*) je prvním vysvětlením, jak je v buněčné stomatální linii asymetrické dělení řízeno (Dong *et al.*, 2009). Působí v odlišných buněčných typech stomatální linie různými efekty. V sesterských buňkách, čili sousedních

buňkách průduchů či jejich prekurzorů, orientuje rovinu dělení a omezuje počet dělení (Dong *et al.*, 2009). Jedná se o receptorům podobnou bílkovinu obsahující leucinová opakování (leucine-rich repeat receptor-like protein) nacházející se ze své větší části vně buňky, která je zakotvena v plazmatické membráně transmembránovou doménou (Dong *et al.*, 2009).

V případě mutanta *tmm* došlo k poruše komunikace mezi buňkami, a tedy špatné orientaci asymetrického dělení sousedních buněk, což se projevilo špatným rozmístěním průduchů a jejich shlukováním (Geisler *et al.*, 2003). Mutant *basl* má ve skutečnosti porušenou asymetrii dělení samotnou a často ji úplně postrádá (Dong *et al.*, 2009). *BASL* kóduje nový protein bez rozpoznatelných homologů mimo rostlinnou říši, v jehož sekvenci lze identifikovat slabý jaderný lokalizační signál a jaderný exportní signál (Dong *et al.*, 2009). Jeho lokalizace se jeví jako velice dynamická a vysoce polarizovaná. Na počátku vývoje epidermálních buněk (16 hodin po klíčení) se BASL nachází u všech buněk v jádře (Dong *et al.*, 2009). V pozdějších fázích vývoje si jadernou lokalizaci zachovává pouze u buněk ze stomatální linie a v buňkách, které do ní nepatří, se lokalizuje na jejich okraji. K této polarizaci dochází ještě před tím, než se navenek projeví jakékoli jiné známky asymetrie v buňkách (Dong *et al.*, 2009). Po asymetrickém dělení mateřské buňky meristemoidu vznikne meristemoid s jadernou lokalizací proteinu BASL a menší dceřiná buňka, u které se jaderný BASL ztratí a zůstane jen okrajový signál na vzdálenější straně buňky od meristemoidu (Dong *et al.*, 2009). Situace, kdy by se okrajový BASL nacházel na straně sousedící s nově vzniklým meristemoidem nebyla pozorována (Dong *et al.*, 2009). Jaderná lokalizace proteinu BASL se v meristemoidech zachovává až do doby, kdy se diferencují v mateřskou buňku svěřací, u které nebyl pozorován BASL ani v jádře ani na periférii buňky. Protein BASL je tedy univerzálním signalizačním mechanismem, který zajišťuje polarizaci asymetrického dělení ve stomatální buněčné linii.



Obr. 3: Model lokalizace a funkce proteinu BASL v buňkách stomatální linie. Lokalizace proteinu BASL na periférii či v jádře je určující pro ustanovení roviny asymetrického dělení v buňkách stomatální linie. Upraveno podle Dong et al., 2009.

Buněčný cyklus je též významným regulátorem buněčného osudu průduchů. Zatímco trichomy a dlaždicové buňky epidermis podstupují endoreduplikaci a zvyšuje se u nich obsah jaderné DNA, svěrací buňky průduchů a jejich prekurzory zůstávají diploidy (Larkin *et al.*, 2003). Lze to demonstrovat na faktu, že ektopická exprese inhibitorů buněčného cyklu či manipulace s regulací cyklinů nemají výraznější vliv na uspořádání průduchů (De *et al.*, 2001; Dewitte *et al.*, 2003).

Dalším velice významným faktorem jsou rostlinné hormony, především gibereliny, etylen a auxin. Hlavní signálem indukující utváření průduchů, jsou právě gibereliny, které zároveň regulují prodlužování hypokotylu (Saibo *et al.*, 2003). Efekt giberelinů je silně podporován etylenem či auxinem.

Velmi zajímavá je koordinace výstavby epidermis s mesofylem, kdy se správně utvořený průduch nalézá nad volným prostorem v mesofylu, nikoli třeba nad žilkami (Geisler

et al., 2000). Rozmístění průduchů je ovlivněno i shora od kutikuly, jak naznačují některá pozorování (Gray *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003). Kutikula je vynikajícím prostředím pro přijímání a distribuci signálů, které regulují hustotu, distribuci a fungování průduchů (Bird & Gray, 2003).

3. Asymetrický růst

3.1. Polarizace

Po ukončení dělivé fáze buněk nastává fáze růstová. Nejčastěji buňky rostou difusně, rovnoměrným zvětšováním plochy buněčné stěny. Ta je u rostoucích buněk plastická a roztažitelná, a tak se pomocí turgoru rozpíná. Nedochozí však ke ztenčování, protože se do ní ukládají nové složky a nedojde proto k jejímu prasknutí.

Charakter růstu významně určuje morfogenezi buněk a orgánů. Je dán hlavně vlastnostmi buněčné stěny, a to především uspořádáním celulózových mikrofibril. Protože tyto mikrofibrily jsou extrémně pevné v tahu, rostou buňky hlavně ve směru kolmém na uložení mikrofibril (Kerstens *et al.*, 2001). V tomto směru jsou schopny se od sebe vzdalovat a posunovat. Po ukončení růstové fáze ztrácí stěna svoji plasticitu a růst je ukončen. Epidermální buňky zvyšují svůj objem difúzním růstem a svých specifických tvarů dosahují díky jeho polarizaci. Mechanismy pro lokalizovanou konstrukci a modifikaci buněčné stěny jsou tedy klíčem k polarizaci difúzního růstu (Yang, 2008).

3.2. Úloha cytoskeletu

Rostlinný cytoskelet skrze sekreci řídí ukládání nového materiálu do buněčné stěny a tím ovlivňuje místo, kde buňka poroste, a směr, kterým poroste. Během rozpínání a prodlužování buněk podstupuje buněčná stěna opakovaně cyklus odbourávání a vyztužování. Zatím nejsou tyto mechanismy dokonale objasněny, ale i tak bylo dosaženo v jejich výzkumu velkého pokroku. Dnes již existuje mnoho poznatků o funkci mikrotubulů a aktinových mikrofilament při řízení buněčného růstu a jeho polarizaci. Cílená sekrece váčků s komponenty buněčné stěny pozorovaná při apikálním růstu pylových láček a kořenových vlásků se využívá i k polarizaci růstu u trichomů a dlaždicových buněk epidermis.

3.2.1. Mikrotubuly

Izotropicky rostoucí buňky ukládají své kortikální mikrotubuly náhodně a neorganizovaně. Buňky, které potřebují dosáhnout nějakého konkrétního tvaru, své kortikální mikrotubuly organizují a využívají jejich vlastností k řízení polarizovaného růstu. V místech, kde je buněčná stěna vyztužena paralelně uspořádanými mikrotubuly, nedochází k laterální expanzi a je umožněn jen elongační růst ve směru kolmém na mikrotubuly (Fu *et al.*, 2005). V buňkách, které využívají difúzního růstu, tak uspořádání kortikálních mikrotubulů stanovuje, kde dojde, a kde nedojde k expanzi buněčného povrchu. Jejich funkci však nelze generalizovat, v jednotlivých buněčných typech se liší.

V dlaždicových buňkách kortikální mikrotubuly ovlivňují polaritu rozpínání buňky regulací signalizace Rho GTPáz (**zkratka**) (Fu *et al.*, 2005). Vysoce dynamické změny uspořádání kortikálních mikrotubulů, jejich polymerizace a depolymerizace umožňuje vytváření charakteristického tvaru dlaždicových buněk. Udržování stability mikrotubulů pomocí stabilizačních faktorů je též velice důležité. Například teplotně sensitivní mutant v genu *MOR1* (*MICROTUBULE ORGANIZATION 1*) způsobuje v dlaždicových buňkách ztrátu lalokovitého tvaru, zapříčiněnou destabilizací mikrotubulů (Whittington *et al.*, 2001). Organizace mikrotubulů v dlaždicových buňkách byla narušena i v mutantech *bot1* (*botero1*), *erh3* (*ectopic root hair 3*), *fra2* (*fragile fiber2*) (Bichet *et al.*, 2001; Burk *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2002).

V morfogenezi svěracích buněk průduchů jsou mikrotubuly a aktinová filamenta průduchů naprosto zásadní. Kortikální mikrotubuly ovlivňují lokální zpevnění buněčné stěny a tak i ledvinovitý tvar svěracích buněk. Radiálně obíhají v periklinálním směru (Lucas *et al.*, 2006). Aktinová mikrofilamenta zprostředkovávají polarizaci cytoplazmy a organel před dělením. U zdravých ledvinovitých svěracích buněk průduchů aktinová filamenta vytváří radiální svazky a účastní se řízení pohybů svěracích buněk na rozdíl od svazků kortikálních mikrotubulů, které na to nemají vliv (Lucas *et al.*, 2006).

V trichomech mikrotubuly indukují větvení. Jejich stabilizace v trichomech vede k navýšení počtu větví a dokáže indukovat větvení v mutantech, kteří původně větvené trichomy nevytvářeli. A pochopitelně jejich destabilizace větvení zamezuje (Mathur & Chua, 2000). Trichomy s porušenými mikrotubuly rostou isotropicky a nevytváří žádné větve

(Hulskamp *et al.*, 1999). Zdá se, že lokální rozpad a nukleace mikrotubulů je v procesu větvení velice důležitá (Schellmann & Hulskamp, 2005). Napovídá tomu efekt mutace v tubulinovém sbalovacím kofaktoru C a A (TUBULIN FOLDING COFACTOR (TFC) C a A), která větvení zabraňuje porušením seskupování α/β dimerů (Kirik *et al.*, 2002b; Kirik *et al.*, 2002a). Stejně jako mutace kataninů, které zajišťují „stříhání“ již existujících mikrotubulů (Burk *et al.*, 2001). Redukovaným dělením se projevuje i mutant v genu *ZWICHEL* (Oppenheimer *et al.*, 1997) s nefunkčním kinesinovým motorem. Transport podél mikrotubulů tedy ovlivňuje také proces větvení trichomů. Dalším stupněm regulace je prostorová organizace mikrotubulů. V této oblasti bylo identifikováno několik genů, které prostorovou organizaci mikrotubulů ovlivňují. Prvním z nich je gen *SPIKE1* (*SPIKE1*) příbuzný s velkou CDM rodinou (*Caenorhabditis elegans* CED-5, human DOCK180 and *Drosophila melanogaster* Myoblast City (MBC)) adaptorových proteinů, která integruje extracelulární signály a reorganizaci cytoskeletu (Schellmann & Hulskamp, 2005). Mutantní rostliny *spk1* se projevují defektním shlukováním mikrotubulů, které zapříčiní ztrátu polarizovaného růstu (Qiu *et al.*, 2002). Druhým genem je *FASS/TONNEAU2*, který reguluje mikrotubuly fosforylací jiných proteinů (Camilleri *et al.*, 2002). Dalším prostorovým regulátorem mikrotubulů je gen *ANGUSTIFOLIA*, který způsobuje vysokou koncentraci mikrotubulů ve špičce trichomové buňky (Folkers *et al.*, 2002).

Mikrotubuly v rostlinných buňkách často označují specializované domény plazmatické membrány. Například při mitóze se preprofázní prstenec formuje v místě, kde se později zformuje nová buněčná stěna, takže určuje rovinu dělení (Lucas *et al.*, 2006). A takovýmto způsobem je vyznačena, nikoli však definována, sekreční doména ve slizových buňkách semenných obalů (McFarlane *et al.*, 2008).

3.2.2. Aktinová mikrofilamenta

Význam aktinu a aktin vázajících proteinů pro polarizaci buněčného růstu a řízení tvaru buňky spočívá jednak ve směřování sekrečních váčků do míst růstu a jednak ve vytváření trojrozměrné vláknité sítě pomocí ARP2/3 komplexu (actin-related protein 2/3), která přímo řídí polarizaci plazmatické membrány tím, že reguluje exocytósu a endocytósu (Li *et al.*, 2003). Aktin do míst růstu směřuje sekreční váčky, anebo tam přímo navádí signální molekuly, typicky Rho GTPázy a jejich aktivátory (Fu *et al.*, 2002). Ty následně zesilují nukleaci aktinu, což vede k ustanovení pozitivní zpětné vazby a vytvoření mohutného

polarizačního aparátu (Li *et al.*, 2003). Signální dráhy odpovídají na signály z venčí a koordinují uvnitř buňky dynamiku cytoskeletu.

V kvasinkových a živočišných buňkách je aktinová nukleace a větvení zprostředkováno evolučně konzervovaným ARP2/3 komplexem a jeho aktivátorovým komplexem Scar/WAVE (suppressor of cyclic AMP receptor/Wiskott-Aldrich syndrome Verprolin-homologous protein) (Li *et al.*, 2003). Homologní geny sedmi podjednotek ARP2/3 komplexu již byly v rostlinách identifikovány (Li *et al.*, 2003). Mutanti s nefunkčními podjednotkami ARP2/3 komplexu se v dlaždicových buňkách projevovali chybnou lokalizací kortikálního F-aktinu (filamentární aktin) do oblastí vchlípenin, čímž zabránili vytváření laloků dlaždicových buněk (Li *et al.*, 2003). V trichomech tyto mutace zapříčinily depolarizaci růstu z důvodu poruchy formace F-aktinové sítě, která se navenek projevila zakrslými větvemi a výrazně zvětšenou stopkou trichomu (Li *et al.*, 2003). ARP2/3 komplex ovlivňuje morfogenezi buněk ustanovováním polaritu buňky a polarizovaného růstu (Li *et al.*, 2003).

3.3. ROP GTPázy

Organizace cytoskeletu rostlin je dynamický proces, jehož rovnováha je regulována ROP GTPázami (Rho of plants guanosin trifosfatáza) a jejich efekty (Fu *et al.*, 2005). Pro utváření buněčné polaritu je naprosto rozhodující její efektivní řízení. K tomu se v průběhu evoluce vytvořilo několik různých komplexních procesů založených na zpětnovazebných smyčkách se spoustou regulátorů.

Jednou z nejprozkoumanějších signalizačních drah u rostlin je přepínání Rho GTPáz, které řídí růst velkým množstvím efektorových a regulačních proteinů. Rodina Rho je třída malých GTPáz, které v buňce fungují jako molekulární přepínače mezi podněty uvnitř buňky a signální transdukční kaskádou. Účastní se regulace cytoskeletu, genové exprese, buněčné polaritu, buněčného cyklu a dalších procesů uvnitř buňky. GTPázy během svého cyklu prochází opakovaně dvěma základními stavy, neaktivním - s navázaným GDP (guanosindifosfát), a aktivním - s navázaným GTP (guanosintrifosfát) (Vernoud *et al.*, 2003). Přepínání je řízeno mnoha regulačními proteiny, mezi které patří proteiny GEF (guanosine exchange factor), GAP (GTPase-activating protein), GDI (GDP dissociation inhibitor) a další efektorové proteiny. Tento systém vedení signálu transdukční dráhou používá GTP nukleotid. V evoluci regulačních procesů eukaryotických buněk se vyselektoval i mechanisticky odlišný

system, který vede signál přes ATP (adenosintrifosfát) nukleotid. ATP modifikuje substrát kovalentně, např. fosforylací. Naopak GTPázový systém založený na GTP nukleotidu těží ze schopnosti GTP nekovalentně se vázat k velkému množství malých GTPázových proteinů a k přenosu signálu využívá konformačních změn těchto proteinů, nikoli jejich kovalentní modifikaci jako ATP (Vernoud *et al.*, 2003). GTPázy se tak stávají ideálním molekulárním přepínačem pro obrovské množství regulačních a signálních transdukčních drah (Vernoud *et al.*, 2003). GTPázy jsou někdy nazývány GTP vázebnými proteiny. To proto, že jejich GTPázová aktivita je ve skutečnosti velmi nízká, což zvyšuje dobu životnosti jejich aktivní konformace s navázaným GTP. GTPázovou aktivitu většinou přebírá regulátor GAP, který hydrolyzuje gama fosfát GTP molekuly a inaktivuje tak GTPázu.

U rostlin byla nalezena podrodina Rho GTPáz, která byla nazvána Rho of plants - ROP. Čím víc je o nich známo, tím je jasnější, že zajišťují univerzální signalizaci při morfogenezi dlaždicových buněk. Funkci ROP GTPáz v dlaždicových buňkách epidermis rostlin lze dobře demonstrovat díky výsledkům výzkumu ROP2. ROP2 je mimo jiné lokalizován ve špičkách kořenových vlásků a jeho zesílená exprese vede k depolarizovaným, cípatým kořenovým vláskům, což naznačuje jeho význam (Jones *et al.*, 2002). V poslední době byla objasněna signalizační síť, která řídí planární polarizaci pokožkových dlaždicových buněk polarizováním difúzního růstu. V kvasinkách a živočiších Rho GTPázy aktivují spoustu efektorových proteinů, které poté vybudí buněčnou odpověď. Stejně tomu je i u rostlin.

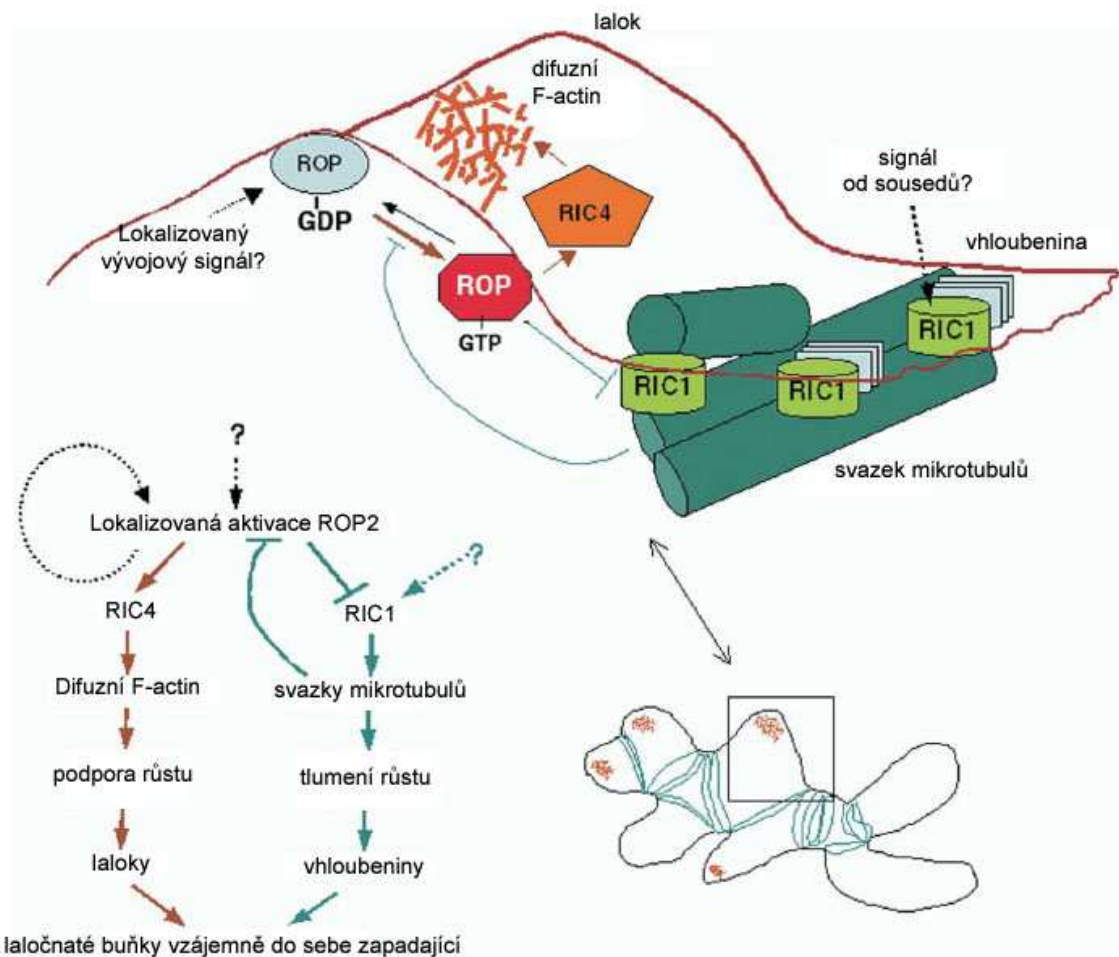
Sekvence aminokyselin malých GTPáz ROP2 a ROP4 se shodují z 97 % a oba jsou exprimovány v listech (Li *et al.*, 1998), v řízení tvaru dlaždicových buněk jsou funkčně redundantní (Fu *et al.*, 2005). ROP2 a ROP4 (ROP2/4) podporují formování kortikálních aktinových mikrofilament a potlačují formování dobře uspořádaných svazků kortikálních mikrotubulů (Fu *et al.*, 2005). Lokálně aktivovaný ROP2/4 v dlaždicových buňkách aktivuje efektorový protein RIC4, který podporuje seskupování kortikálních aktinových mikrofilament, které jsou potřebné pro lokalizovaný výběžek buňky (Fu *et al.*, 2005). Zároveň ROP2/4 lokálně inaktivuje RIC1 (ROP interacting CRIB (Cdc42/Rac-interactive binding) motif containing proteins), který jinak v aktivní formě stimuluje organizaci kortikálních mikrotubulů a tedy vytváření zúžených krčků dlaždicových buněk. Aktivní RIC1 lokálně zabraňuje formování lalokovitého výběžku a následně tlumí aktivitu ROP2/4 v tomto místě (Fu *et al.*,

2005). ROP2/4-RIC4 dráha a RIC1 dráha se tak navzájem vylučují. Kortikální domény laloků a vhloubeniny jsou vymezeny pomocí protichůdnosti těchto dvou signalizačních drah.

Protein RIC1 v buňce kolokalizuje s kortikálními mikrotubuly. Na počátku vývoje dlaždicových buněk se nachází v plazmatické membráně stejně jako mikrotubuly a později u starších buněk se RIC1 vyskytuje výhradně přímo u mikrotubulů (Fu *et al.*, 2005). V takovém případě je možné pozorovat tečky GFP (green fluorescent protein) značeného RIC1 podél mikrotubulárních vláken. In vitro byla prokázána částečná asociace RIC1 s polymery mikrotubulů (Fu *et al.*, 2005) naznačující jeho příslušnost k MAPs (Microtubule Associated Proteins). Protein svou přítomností napomáhá mikrotubulům ke správnému uspořádání v oblasti zúžených krčků dlaždicových buněk a zabraňuje tak v těchto místech laterální expanzi (Fu *et al.*, 2005). Vysoká exprese RIC1 kompletně potlačuje vytváření laloků a dává vzniknout prodlouženým, úzkým buňkám s rovnými obrysy. Naopak konstitutivně aktivní mutant CA-rop2 zabraňuje formování správně uspořádaných mikrotubulů a vznikají pak širší buňky, též s rovnými obrysy (Fu *et al.*, 2005). Z toho vyplývá, že účinky ROP2/4 a RIC1 při řízení buněčné expanze jsou opačné. Pomocí FRET (Förster resonance energy transfer) bylo prokázáno, že aktivovaný RIC1 se může vázat pouze k aktivnímu ROP2/4, který následně v blízkosti plazmatické membrány potlačuje funkci RIC1. RIC1 navázané k ROP2/4 totiž nemůže interagovat s mikrotubuly a podporovat jejich organizaci.

Druhým známým proteinem interagujícím s ROP GTPázami je RIC4 (interaktor ROP1 v pylových láčkách), který se účastní i polarizace růstu dlaždicových buněk epidermis. Stejně jako RIC1, interaguje RIC4 pouze s aktivní formou ROP2/4. ROP2/4 je pravděpodobně aktivován preferenčně právě v oblastech, kde vzniká lalok, a v těchto místech RIC4 následně zvyšuje uspořádání jemných kortikálních aktinových mikrofilament (Settleman, 2005). Zesílená exprese RIC4 zvyšuje akumulaci a distribuci jemných mikrofilament až o 80 % (Fu *et al.*, 2005). Naopak vyřazení RIC4 z funkce způsobuje zúžení v oblastech krčků a méně výrazné laloky. Kortikální mikrotubuly v místě vhloubeniny signalizují zpět k ROP2/4 a brání tak aktivaci ROP2/4 (Fu *et al.*, 2005). Signál vedou přes RIC1, který je schopný v místě své lokalizace inhibovat ROP2/4 signalizaci a prostorově ovlivňovat interakci ROP2/4 s RIC4. Do této regulace se zapojují i kortikální mikrotubuly, které v případě své uspořádanosti váží RIC1 a naopak při jejich rozvolnění RIC1 neváží, a to se pak účastní kompetice s RIC4 o aktivní

ROP2/4. Tyto dva různé signalizační výstupy od aktivovaných ROP2/4 GTPáz kriticky ovlivňují morfogenezi dlaždicových buněk.



Obr. 4: Model fungování ROP GTPáz při morfogenezi dlaždicových buněk. Vyobrazeny jsou dvě dráhy, které působí opačně na rozpínání buněk - dráha ROP-RIC4 pomocí kortikální sítě F-aktinu podporuje formování vychlípeniny, zatímco RIC1 dráha rozpínání omezuje a vytváří oblasti krčků. Upraveno podle Fu et al. (2005).

RIC1 patří do rodiny efektorových proteinů ROP, které interagují s aktivní formou ROP GTPáz pomocí CRIB motivu. Dalo by se říci, že to jsou cíle ROP GTPáz (Wu *et al.*, 2001). Funkce RIC1, podporovat uspořádání kortikálních mikrotubulů, je aktivovaná dalším členem

rodiny ROP GTPáz, malou GTPázou ROP6 (Fu *et al.*, 2009). Vyřazení ROP6 z funkce způsobuje náhodné uspořádání kortikálních mikrotubulů a tudíž ztrátu lokálních zúženin. Jeho zesílená exprese vede ke zvýšení organizace kortikálních mikrotubulů a způsobuje tak cylindrický tvar dlaždicových buněk namísto lalokovitého. ROP6 se váže k RIC1 a aktivuje ho, čímž umožňuje uspořádání mikrotubulů (Fu *et al.*, 2009). Pro mechanismus interakce RIC1 a ROP6 připadají v úvahu dvě možnosti. Buď přechodná interakce vede ke změně konformace RIC1, což má za následek jeho asociaci s kortikálními mikrotubuly, nebo interakcí, např. fosforylací, dochází ke kovalentní modifikaci RIC1. RIC1 i ROP6 se účastní jedné signalizační dráhy a stejným způsobem ovlivňují laterální expanzi buněk a vytváření vhloubenin a výběžků. ROP6 má opačnou roli než ROP2/4. ROP2/4 se preferenčně lokalizuje v oblastech výběžků, kde umožňuje vytvoření laloku jednak aktivací RIC4, který zprostředkovává akumulaci jemných aktinových mikrofilament, a dále inaktivací RIC1, který je tak izolován od kortikálních mikrotubulů a nedochází k jejich organizaci. ROP6 na druhou stranu v oblastech zúžených krčků aktivuje RIC1 a podporuje jeho asociaci s kortikálními mikrotubuly. Je zajímavé, že se ROP2/4 a ROP6 účastní těchto navzájem si konkurujících signálních drah, ačkoli patří oba dva v rámci rodiny ROP do stejné větve.

Interaktorů ROP2/4 je pravděpodobně více. Jedním z možných aktivátorů je protein SPK1. Mutant *spk1* vykazuje v trichomech a v dlaždicových buňkách podobné fenotypy jako mutanti v ROP GTPázách (Qiu *et al.*, 2002). Dalším možným aktivátorem, který přichází v úvahu je některý protein z rodiny ROP-GEFů. Již bylo prokázáno, že ROPGEF1 aktivuje ROP1 při růstu pylových láček, a tak se spekuluje o jednom nebo více ROP-GEFů aktivujících ROP2/4 v dlaždicových buňkách (Gu *et al.*, 2006).

Protein SCN1 (SUPERCENTPEDE1) je další uvažovaný regulátor ROP2/4, u kterého byla prokázána funkce při prostorovém určení jednoho konkrétního místa růstu trichoblastu (Carol *et al.*, 2005). SCN1 patří do rodiny RhoGDI, jejichž primární funkce je vázat Rho proteiny a lokalizovat je do cytosolu pryč od membrány, čímž zabraňují aktivaci Rho proteinů pomocí RhoGEF proteinů. Ovšem nesprávná lokalizace ROP2/4 v *scn1* mutantech naznačuje možnou účast v prostorové lokalizaci ROP2/4 (Carol *et al.*, 2005).

Jedním z odhalených efektorů ROP GTPáz je protein ICR1 (INTERACTOR OF CONSTITUTIVE ACTIVE ROPs 1), který definuje novou třídu efektorů ROP v rostlinách (Lavy *et*

al., 2007). Byla prokázána jeho interakce s ROP6 a ROP8. Mutantní rostliny *icr1* měly deformované dlaždicové buňky a kořenové vlásky (Lavy *et al.*, 2007). Navíc ICR1 může interagovat zároveň s ROP GTPázou a s **AtSEC3 (zkratka)** a proto bylo navrženo, že funguje jako „scaffold“ membránový protein, který zprostředkovává interakci ROP GTPáz s dalšími regulačními proteiny (Lavy *et al.*, 2007).

3.4. Sekreční dráha

Intenzivní studium procesů sekreční dráhy především buněk *Saccharomyces cerevisiae* a savčích buněk přineslo v posledním desetiletí již mnoho poznatků. Rostliny jako eukaryotické organizmy disponují sekrečním systémem, jehož základní obrysy jsou totožné s těmi v živočišných a kvasinkových buňkách. Ovšem v dalších podstatných věcech se značně liší a to především ve tvaru a fungování organel endomembránového systému. Nejpatrnějším odlišujícím rysem je specializace při syntéze mnoha komponentů buněčné stěny a existence vakuoly.

Sekreční drahou proudí nejvýznamnější část biosyntézy v buňce. Proteiny translatované na membráně endoplazmatického retikula (ER) a lipidy v ER syntetizované cestují přes Golgiho aparát, kde dochází k jejich úpravě a syntéze celulózy a hemicelulózy. Z Golgiho aparátu směřují na plazmatickou membránu, kde jsou exocytovány do extracelulární matrix nebo k jiným příslušným organelám, třeba vakuole. Tento proces exocytózy se nazývá anterográdní transport. Opačným směrem z extracelulární matrix přes plazmatickou membránu nebo materiál z plazmatické membrány proudí dovnitř buňky procesem endocytózy, tzv. retrográdním transportem. Endocytovaný materiál dále míří přes systém endosomů do vakuoly. Ve všech fázích těchto transportů je translokace materiálu zajištěna pomocí váčků a cytoskeletu. Tyto váčky pučí z membrány donorového kompartmentu za pomoci komplexu obalových proteinů, které se shromažďují v místě vzniku váčku a napomáhají deformovat membránu. Po dokončení formování váčku dojde k jeho odstřižení a uvolnění. Poté váček za pomoci cytoskeletárních motorů a tzv. docking faktorů cestuje přes cytoplazmu k místu určení. Fáze rozpoznání správného cílového kompartmentu se odehrává pod taktovkou docking a tzv. tethering faktorů společně s proteiny rodiny SNARE (SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor). Váček musí rozpoznat správný kompartment za pomoci integrálních signálních proteinů v membráně váčku a integrálních receptorů

v membráně cílového kompartmentu a následně splynout s jeho membránou a doručit svůj obsah na místo určení.

Role exocytosy v řízení polarizace epidermálních buněk rostlin je naprosto zásadní, stejně jako v jiných eukaryotických systémech (Zajac *et al.*, 2005; Brennwald & Rossi, 2007). Exocytosa dokáže polarizovanou přestavbou a výstavbou buněčné stěny vytvořit kořenové vlásky či pylové láčky, extrémně polarizované buňky (Sieberer *et al.*, 2005). Komponenty sekreční dráhy společně s cytoskeletem buňky společně vytváří buněčnou polaritu v odpovědi na extracelulární polarizační signál. Aktinová mikrofilamenta, mikrotubuly a cílená sekrece tak buňce umožňují efektivně řídit její růst a výsledný tvar.

4. Buněčná stěna epidermis a role sekrece při formování buněčné stěny

4.1. Sekrece komponentů buněčné stěny

Ukládání materiálů buněčné stěny rostlin je úzce spjaté s cytoskeletem. Kortikální mikrotubuly se v rostoucích buňkách ukládají kolmo ke směru růstu na vnitřní straně plazmatické membrány paralelně s mikrofibrily celulózy na straně druhé (Baskin *et al.*, 2004). Polymerní vlákna celulózy jsou syntetizována komplexem celuloza syntázy, který je asociovaný s plazmatickou membránou (Crowell *et al.*, 2009). Tyto komplexy jsou tam dopravovány sekreторickou drahou za účasti cytoskeletu a Golgiho aparátu (Crowell *et al.*, 2009). Vztah mezi uspořádanými kortikálními mikrotubuly a mikrofibrilami celulózy nebyl dosud plně objasněn. Podle jedné hypotézy kortikální mikrotubuly řídí ukládání celulózních mikrofibril tím, že fungují jako kolejnice pro celulóza syntázu, určují její trajektorii, a tím ovládají ukládání celulózy v buněčné stěně (Hasezawa & Nozaki, 1999; Ehrhardt & Shaw, 2006). Ovšem některá pozorování této hypotézy odporují. Například experimenty, které demonstrovaly, že nepřítomnost organizovaných kortikálních mikrotubulů nemusí vždy porušit paralelní orientaci celulózových mikrofibril (Himmelsbach *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2003).

Na rozdíl od celulózy a kalózy, které jsou syntetizovány komplexy asociovanými s plazmatickou membránou, je polysacharidová matrix syntetizována v Golgiho aparátu a pomocí váčků sekreторické dráhy je dopravována k plazmatické membráně (Sandhu *et al.*,

2009). Polysacharidy matrix vytváří velké množství různých glykosidických vazeb a liší se mezi sebou svými cukernými zbytky (Sandhu *et al.*, 2009). Poté, co jsou sekretovány do buněčné stěny mezi sebou začnou vytvářet vazby a vázat se k mikrofibrilám celulózy, čímž vytvoří pevnou, ale zároveň pružnou síť (Sandhu *et al.*, 2009). Stejně jako pektiny jsou v Golgiho aparátu syntetizovány i hemicelulózy, které jsou následně do buněčné stěny transportovány pomocí váčků (Wulff *et al.*, 2000).

4.2. Kutikula

Na povrch epidermálních buněk - dlaždicových buněk, průduchů i trichomů - rostliny vylučují kutikulu. Tato kontinuální hydrofobní vrstva představuje bariéru pro vodu a v ní rozpustné látky, kryje primární tělo rostliny a brání ji před UV světlem, mrazem, smáčením, odpařováním vody a pronikáním patogenů nebo klíčením mikrobů na povrchu listů. Kutikula hraje důležitou roli i ve vývoji rostlinného těla, kdy zabraňuje srůstu orgánů. Sestává ze dvou základních vysoce lipofilních složek, kutinu a kutikulárních vosků. Kutin je tvořen polymery ω mastných kyselin, které díky své mechanické odolnosti fungují jako opora a stavební kostra kutikuly (Samuels *et al.*, 2008). Monomery kutikulárních vosků vyplňují prostor mezi polymery kutinu a primárně zabraňují nestomatálním ztrátám vody (Samuels *et al.*, 2008). Kutikulární vosk je tak jednou z klíčových adaptací rostlin pro život na souši. Složením se odlišují od epikutikulárních vosků vylučovaných na povrch kutikuly, kde na vzduchu při překročení určité hranice dochází k formování voskových krystalů zakotvených v amorfni směsi vosků protkané kutinem (Dickinson & Preece, 1976). Konkrétní složení těchto ochranných vrstev je druhově specifické a jejich diverzita umožňuje přesnou adaptaci jednotlivých druhů na jejich prostředí (Müller & Riederer, 2005). Ohromný význam kutikuly pro rostlinu se odráží i v opravdu značné „energeticko-logistické“ investici epidermálních buněk do její produkce, což lze vidět například také na transkriptomu epidermis v průběhu růstu lodyhy (Suh *et al.*, 2005).

Syntéza vosků začíná v plastidech syntézou mastných kyselin a končí biosyntézou dlouhých řetězců mastných kyselin, alkoholů, aldehydů a alkanů v ER. Poznatky týkající se biosyntézy komponent kutikulárních vosků jsou přehledně shrnuty v review (Samuels *et al.*, 2008b) a (Kunst & Samuels, 2003). Způsob, jakým se prekurzory kutikuly dostávají na povrch epidermis, je zatím z velké části nejasný a patří k aktivně se rozvíjejícím oblastem výzkumu

rostlinné buňky. V posledních letech byla této problematice věnována větší pozornost a bylo dosaženo dílčích poznatků. Znalosti o většině fází transportu přesto končí na úrovni hypotéz.

Transport z ER k plazmatické membráně v současnosti není dostatečně objasněn. Existují dvě hypotézy o možných mechanismech, jak se hydrofobní látky transportují ze svého původního nepolárního prostředí do prostředí apoplastu.

Podle první hypotézy by se mohly složky kutikuly dostávat do plazmatické membrány jinak než klasickou sekretorickou drahou, a to v místech přímého blízkého kontaktu plazmatické membrány s ER. Napovídají tomu experimenty, kdy pomocí mrazového lámání byla pozorována blízká asociace plazmatické membrány s ER. Docházelo k přiblížení až na vzdálenost 10 nm, nikoli však ke splynutí (Craig & Staehelin, 1988). Pokud takovýto přímý přenos lipidových molekul z ER do plazmatické membrány skutečně probíhá, musí být velmi pečlivě řízen tak, aby se neporušilo unikátní složení obou kompartmentů, jelikož membránové lipidy plazmatické membrány obsahují nasycenější mastné kyseliny a více sterolů než ER. Přímý pohyb lipidů nezprostředkovaný váčky v opačném směru, z plazmatické membrány do ER, byl již pozorován při experimentech se sojovými buňkami a fosfatidylcholinem (Grabski *et al.*, 1993).

Podle druhé hypotézy by vosky mohly být přemísťovány váčkovým transportem přes Golgiho aparát a dále k plazmatické membráně (Schulz & Frommer, 2004). Stejně jako kutikulární vosky nebo suberin, i sfingolipidy jsou tvořeny dlouhými řetězci mastných kyselin. U sfingolipidů byl prokázán transport pomocí klasické sekretorické dráhy z ER přes Golgiho aparát na plazmatickou membránu u savců, *S. cerevisiae* i rostlin (shrnuto v (Moreau *et al.*, 1998), což naznačuje, že i v případě kutikulárních vosků by transport sekretorickou drahou mohl být možný.

Méně pravděpodobné hypotézy navrhují přepravu pomocí speciální váčkové dráhy buď vytvořením oleosomových tělísek pokrytých bílkovinami příbuznými oleosinu, nebo váčky, které by zabudovávaly kutikulární lipidy do lipidových raftů. Také se nabízí možnost navázání k hypotetickému proteinu vázajícímu mastné kyseliny, který by byl následně relokován k přenašeči v plazmatické membráně (Panikashvili & Aharoni, 2008).

Další fází exportu kutikulárních vosků ven z buňky je jejich uvolnění přes lipidovou dvojvrstvu plazmatické membrány do apoplastu, o níž je zatím známo jen to, že je pravděpodobně zprostředkována ABC (ATP binding cassette) transportéry. Tato vysoce konzervovaná rodina membránových přenašečových proteinů zahrnuje proteiny s ATP vazebnou kazetou. V genomu *Arabidopsis* bylo dosud identifikováno 129 genů pro ABC transportéry, ovšem k většině z nich jsme zatím nebyli schopni přiřadit funkci (Sugiyama *et al.*, 2006). Nás bude zajímat největší podrodina WBC (White-Brown Complex homolog), která obsahuje 28 genů (Sugiyama *et al.*, 2006). Do ní patří i geny *WBC12* (též název *CER5*) a *WBC11* (též názvy *DSO* a *COF1*), které byly identifikovány právě jako přenašeče kutikulárních lipidů přes plazmatickou membránu. U obou mutantů - *cer5* a *dso* - se vosky akumulovaly uvnitř buňky, nedošlo k jejich transportu ven a kutikula tak byla redukována.

Mutanti *cer* (*eceriferum* - *cer1*, *cer2*, *cer3*, *cer5*, *cer6* a *cer10*) mají lesklý nematný povrch, což je způsobeno porušením nějakého článku biosyntézy, transportu nebo ukládání kutikulárních vosků (Kunst & Samuels, 2003; Samuels *et al.*, 2008). Mezi nimi byl právě identifikován *cer5*, který kóduje ABC transportér z WBC podrodiny (Pighin *et al.*, 2004). Je zajímavé, že *CER5* je exprimován v plazmatické membráně epidermálních buněk všech orgánů, včetně kořenů, zatímco *cer5* fenotyp je pozorován jen u listů a stonku (Panikashvili *et al.*, 2007). Buňky mutantu *cer5* byly jako obvykle vyplněny centrální vakuolou, kterou obklopovala na okraji cytoplazma, ta ale navíc občas zasahovala až do vakuoly. Dále se v buňce objevily zvláštní lineární lipidické inkluze, které byly pozorovány právě jen v epidermis (Pighin *et al.*, 2004) a odlišovaly tohoto mutantu od ostatních dosud známých mutantů s defektní kutikulou z důvodu poruch metabolické dráhy biosyntézy složek kutikuly (např. *gurke*, *pticcino3*, *yre*, *wax2*, *hth*, *fdh*, *ale1*, *acr4*). Objem povrchových vosků se značně snížil, ale celkový objem vosků - extracelulární a intracelulární - zůstal u mutantu skoro nezměněn. Takže biosyntéza vosků nebyla oslabena, ale produkty ke tvorbě kutikuly byly zadrženy uvnitř v buňkách. Z toho vyplývá, že *CER5* se účastní transportu monomerů vosků, nikoli jejich biosyntézy (Pighin *et al.*, 2004). Nicméně dosud neexistuje přímý důkaz, že *CER5* transportuje vosky přímo jako substrát. Nelze vyloučit možnost, že pouze nepřímě reguluje aktivitu jiných transportérů. Funkční ABC transportér obsahuje dvě ABC domény a dvě transmembránové domény v jednom polypeptidovém řetězci (Schulz & Kolukisaoglu, 2006) nebo vznikne dimerizací dvou polovičních proteinů (monomerů) vytvořením homodimerů či

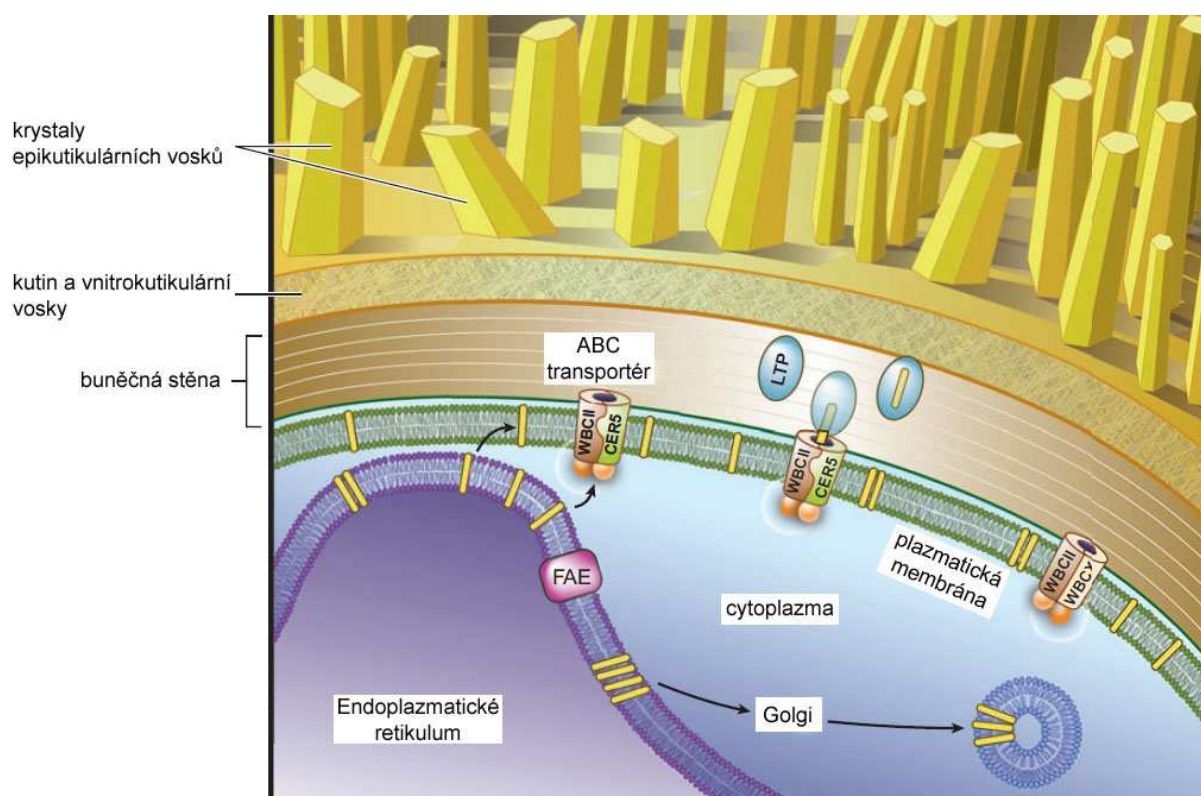
heterodimerů (Rea, 2007). Sekvence *CER5* napovídá tomu, že se jedná jen o poloviční protein, který pro správné fungování dimerizaci vyžaduje. Atraktivním kandidátem k vytvoření heterodimeru je příbuzný WBC11 (Samuels *et al.*, 2008). Oba dva se účastní transportu lipidů, jejichž spektrum se u *CER5* a WBC11 z části překrývá a z části liší. V úvahu také přichází některý z velice sekvenčně podobných proteinů WBC13 a WBC15, u kterých ovšem zatím nebyla určena jejich funkce. Fakt, že buňky dvojitéch mutantů *cer5wbc11* stále byly schopny vylučovat nějaké množství povrchových vosků, naznačuje pravděpodobnou existenci dalších cest a proteinů účastnících se exportu prekurzorů kutikuly a nechává tak široké pole pro bádání.

Výše zmíněný protein WBC11 (COF1, DES) zprostředkovává transport jak voskových, tak kutinových monomerů, zatímco *CER5* transportoval jen monomery vosků (Bird *et al.*, 2007). Funkci lipidického transportéru naznačuje stejně jako u mutantu *cer5* přítomnost cytoplazmatických lipidických inkluzí, které se v mutantovi *Arabidopsis wbc11* nacházejí jen v buňkách epidermis listů a stonku, nikde jinde (Panikashvili *et al.*, 2007). Buňky *wbc11* se projevují špatně tvarovanými průduchy a abnormálním uspořádáním dlaždicových buněk (Panikashvili *et al.*, 2007). Technikami SEM (skenovací elektronové mikroskopie) jsou pozorovatelné praskliny v epidermis a dehydratované trichomy se zkrácenými stopkami a nepravidelným větvením, které stejně jako u mutantu *bodyguard* (viz. níže) často kolabují, pravděpodobně z důvodu pozměněného vývoje okolních podpůrných buněk. Tyto podpůrné buňky nejspíše obsahují unikátní složku, jako třeba suberin, která jim dodává dostatečnou sílu k udržení trichomů (Panikashvili *et al.*, 2007). Spektrum vad mutantu *wbc11* je mnohem širší, objevují se u něj například zkroucené okvětní lístky, pokroucené nitky tyčinek, špatně formované kónické buňky abaxiální epidermis korunních lístků nebo sterilita zapříčiněná defekty reprodukčních orgánů (Panikashvili *et al.*, 2007) a sterilita pylu z důvodu poškození pylového obalu (Bird *et al.*, 2007). Sterilní pyl je také častým projevem u některých *cer* mutantů (konkrétně *cer1*, *cer3*, *cer6*, *cer8*, a *cer10*) se změněným množstvím voskových složek, kdy nefunkčnost pylu bylo možné překonat zvýšením množství vodní páry či CO₂ (Preuss *et al.*, 1993).

Fenotyp mutantu *wbc11*, který si zaslouží samostatnou zmínku, je srůst orgánů (který u mutantů *cer5* nebyl pozorován) (Panikashvili *et al.*, 2007). Jedním z nejstarších mutantů *Arabidopsis* s identifikovanými srůsty orgánů byl *fiddlehead* (Lolle *et al.*, 1992). Nejčastěji

srůstají listy přízemní růžice a okvětní lístky, ale byly pozorovány i srůsty mezi různými typy vegetativních orgánů s reproduktivními nebo poměrně vzdálených částí rostliny. Srůst dospělých částí rostliny je unikátní fenomén, ke kterému dochází, pokud se oslabí hydrofobní vlastnosti kutikuly, což má za následek zvýšení náchylnosti k přilnutí a spojení mezi povrchy orgánů (Panikashvili *et al.*, 2007). Kutikula hraje hlavní roli v negativní i pozitivní regulaci srůstů, ke kterému může docházet i přirozeně, nejčastěji v době reprodukčního vývoje (např. při vývoji plodolistů). Přilnutí buněčných stěn takto přiblížených povrchů je doprovázeno vymizením kutikuly v oblasti kontaktu (Lolle *et al.*, 1998). TEM analýza (transmission electron microscopy) příčných řezů srůstové oblasti ukázala, že mezi dvěma srostlými listy *wbc11* je skutečně nesouvislá vrstva kutikulárního materiálu, což má za následek adhezi buněčných stěn a následně jejich kopolymerizaci (Panikashvili *et al.*, 2007). Bylo identifikováno mnoho jiných mutantních rostlin se zasaženou biosyntézou složek kutikuly (např. *gurke*, *psiccino3*, *yre*, *wax2*, *hth*, *fdh*, *ale1*, *acr4*), která měla za následek srůsty orgánů. Tyto výsledky podtrhují klíčový význam neporušené kutinové vrstvy při prevenci tohoto fenoménu (Panikashvili *et al.*, 2007).

Protože ze sekvence *WBC11* také vyplývá, že se jedná jen o poloviční protein, který pro správné fungování vyžaduje dimerizaci, vyvstává u něj možnost specifikace substrátu dimerizací s různými partnery. Kromě dimerizace s CER5 pro transport vosků bylo navrženo vytvoření homodimeru ze dvou polovičních proteinů *WBC11* nebo utvoření heterodimeru s dalším členem *WBC* podrodiny, které by sloužily k transportu kutinu (Panikashvili *et al.*, 2007). Na rozdíl od CER5 je *WBC11* exprimován nejen v epidermálních buňkách, ale i v buňkách mezofylu (Panikashvili *et al.*, 2007), a bude se tedy pravděpodobně účastnit transportu také jiných látek podobných kutikulárním lipidům. Tomu napovídá i jeho exprese v kořenech, kde se jako vhodný kandidát zdá suberin, který má podobné složení jako kutin a v kořenech se ukládá. Tato možnost je velice lákavá, protože již dříve bylo prokázáno, že leckterý ABC transportér je schopný přenášet několik strukturně odlišných sloučenin (Yazaki, 2006). Pomocí GFP fluorescence byla prokázána lokalizace *WBC11* v plazmatické membráně na kutikulární straně epidermálních buněk, která silně korelovala s lokalizací CER5 (Panikashvili *et al.*, 2007). Tato polarizovaná lokalizace je nesmírně důležitá pro ustanovení apiko-basální polarity a správné vylučování kutikuly. Ovšem konkrétní mechanismus, jak je toho dosahováno, je zatím nejasný.



Obr. 5: Transport komponentů kutikuly. Znáznorněny jsou uvažované cesty transportu kutikulárních materiálů na plazmaticou membránu (přímým přenosem z ER na plazmatickou membránu či sekretorickou drahou) a transportu přes plazmatickou membránu (homo a heterodimery ABC transportérů) a přes buněčnou stěnu (LTP). Upraveno podle Samuels et al. (2008).

Jako zatím nejpravděpodobnější navržené řešení se zdá myšlenka lipidových raftů (k detergentům rezistentní membrány). Existence tzv. lipidových raftů v rostlinách byla již experimentálně prokázána a proteiny asociované s těmito doménami umožňují pochopit rostlinnou buněčnou polaritu a procesy tvorby buněčných povrchů (Borner *et al.*, 2005). Lipidové rafty jsou ostrůvky uvnitř plazmatické membrány, které se od okolí liší skladbou lipidů. Většinou je v nich navýšen obsah sfingolipidů a sterolů a hydrofobní řetězce membránových lipidů jsou více nasycené než v ty okolí. Toto unikátní složení části membrány jim umožňuje tříditi membránové proteiny, které se k nim naváží, a tak lokalizovat a shromažďovat konkrétní proteiny na správných místech (Bhat & Panstruga, 2005). Avšak k prokázání asociace WBC11 a CER5 s lipidovými rafty plazmatické membrány epidermálních buněk chybí dostatek experimentálních dat.

Vedle studia mechanismů biosyntézy kutikuly a ABC transportérů důležitých pro transport složek kutikuly, by mohl přinést další zajímavé poznatky i výzkum proteinu BODYGUARD (BDG) (Kurdyukov *et al.*, 2006a). Tento protein je exprimován jen v buňkách epidermis, kde je navíc polarizovaně lokalizován především na vnější - povrchové straně buněk. *BDG* kóduje člena podrodiny proteinů s α/β -hydrolasovým motivem/doménou. Fenotyp mutantních rostlin *Arabidopsis bdg* se nijak výrazně neliší od jiných dříve objevených mutantních rostlin s defektní kutikulou - srůst orgánů, abnormální morfologie listů, špatně tvarované pokožkové buňky a trichomy, praskliny epidermis, snížená odolnost vůči ztrátám vody atd. Byla pro něj navržena funkce extracelulární syntázy odpovědné za formování struktury kutikuly *in situ* na povrchu kutikuly (Kurdyukov *et al.*, 2006b). Charakteristickým projevem mutanta *bdg* je tedy porušení vnitřní struktury kutikuly způsobené nesprávným ukládáním materiálů, kdy se nevytvoří souvislá vrstva základní kutikuly. Normální kutikula vypadá jako kontinuální, pravidelně vrstvená cca 20 - 30 nm tlustá elektron-densní struktura, která se ukládá nad světlejší buněčnou stěnou. U mutanta *bdg* jsou vrstvy nepravidelné až výrazně narušené a objevují se v nich prázdné prostory (Kurdyukov *et al.*, 2006a). Podobné narušení struktury kutikuly bylo zatím zaznamenáno jen u mutanta *ace/hth* specifického pro epidermis (Kurdyukov *et al.*, 2006b), který má poškozenou ω -alkohol dehydrogenázovou aktivitu při syntéze mastných kyselin. Ačkoli má mutant *bdg* porušenou syntázu, nesnižuje se množství extracelulárních lipidových polymerů, nýbrž nárůstá 1,2 - 3x. Stejně tak nedochází k výrazné změně poměru jednotlivých složek, jak by se dalo očekávat, a jak bývá zvykem u jiných mutantních rostlin s defektní kutikulou. Tento fakt naznačuje, že BDG by mohl být potřebný nikoli pro syntézu, nýbrž pro síťování molekul, které tvoří součást kutikulární vrstvy buněčné stěny a vlastní kutikuly, anebo by mohl být důležitý pro polymerizaci kutinových polyesterů (Kurdyukov *et al.*, 2006a). (Zajímavé je, že stejně jako u předchozích proteinů (CER5 a WBC11) byla u BDG prokázána aktivita v rhizodermis kořene, ten nicméně viditelnou kutikulu postrádá.) Konkrétní mechanismus, kterým je zajištěna polarizovaná exprese BDG v rámci buňky nebyl bohužel objasněn. Pro pravdivost hypotézy o působení *in situ* svědčí polarizovaná lokalizace a akumulace BDG v místě buněčné stěny, kam se ukládají kutikulární lipidy, a dále jeho podobnost s kutinázou. Ta má schopnost hydrolyzovat kutin a zároveň syntetizovat velké množství karboxylových esterů, takže by toho mohl být schopen i BDG a modifikovat tak strukturu kutikuly. Velkou výzvou do budoucna zůstává objasnění toho, jakou roli hraje BDG

v odpovědi na buněčnou signalizaci a v následnou modulaci proliferace meristémů, změně morfologie a buněčné diferenciaci.

Export kutinu je ještě méně objasněný než export kutikulárních vosků. Není známo, zda k jeho polymeraci dochází uvnitř nebo vně buňky a tedy, zda jsou přes plasmatickou membránu transportovány monomery, oligomery, či polymery. V případě, že by export zajišťovaly ABC transportéry, stejně jako u kutikulárních vosků, byly by transportovány monomery (např. acylglyceroly) a k jejich polymerizaci by tedy musela probíhat extracelulární (Bird *et al.*, 2007).

Primární buněčná stěna pokožkových buněk je 0,25 - 0,5 μm tlustá hydrofilní vrstva zpevněného gelu utkaného ze dvou až tří vrstev celulóznic mikrofibril, doplněných hemicelulózami a to vše je spojené matrix z pektinů a proteinů (Carpita *et al.*, 2001). Pektinová matrix (směsice homogalakturonanů a rhamnogalakturonanů) určuje průchodnost a porositu stěny (Doblin *et al.*, 2010). Nad ní se nachází sekundární buněčná stěna, která v buňce plní funkci mechanické ochrany a brání epidermis před deformacemi. Nad sekundární buněčnou stěnou se ještě ukládá pektinová vrstva s celulózovými mikrofibrilami, která je v přímém kontaktu s kutikulárními lipidy na periklinální straně povrchu a v přímém kontaktu se střední lamelou na antiklinální straně (Doblin *et al.*, 2010). Po té, co jsou prekurzory vosků exportovány ven z buněk epidermis, musí se dostat ke kutikule přes prostředí buněčné stěny, což vzhledem k jejímu hydrofilnímu složení není nikterak snadné.

Dlouhou dobu se atraktivními prostředníky tohoto přenosu zdály být lipidové transferové proteiny (LTP). Napovídala tomu jejich silná exprese v epidermis a sekrece do apoplastu, vhodná velikost pro procházení přes póry buněčné stěny a hydrofobní kapsa v jejich struktuře vhodná pro dlouhé řetězce mastných kyselin (Gincel *et al.*, 1994). Na svém N konci obsahují signální hydrofobní sekvenci, která by mohla naznačovat jejich nasměrování do sekreční dráhy a do extracelulárního prostoru buněčné stěny a kutikuly (Pyee *et al.*, 1994). Nicméně tato hypotéza nebyla nikdy experimentálně prokázána. Navíc existují fakta, která ji zpochybňují. Modelování ukazuje, že řetězce dlouhých mastných kyselin voskových prekurzorů se do hydrofobní kapsy ve skutečnosti nevejdou (Keresztessy & Hughes, 1998). V neprospěch hypotézy hovoří i pokusy se substrátovými preferencemi (Zachowski *et al.*, 1998).

Alternativní hypotéza nepočítá s přenašeči, nýbrž předpokládá, že ačkoli je buněčná stěna převážně hydrofilního charakteru, dokáže lokálně vytvářet hydrofobní subdomény z polysacharidů a proteinů jako např. glycinem bohatých bílkovin, u kterých byla predikována sekundární struktura beta listů s velkým hydrofobním povrchem (Sachetto-Martins *et al.*, 2000). Takovýmito kanály by hydrofobní voskové prekurzory mohly usnadněně procházet až k povrchu.

Následný pohyb vosků kutikulou by neměl být až tak obtížný. Komponenty kutikulárních vosků se samy organizují do krystalických a amorfních zón, jak bylo potvrzeno pomocí FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) (Merk *et al.*, 1998). Amorfními zónami se mohou vosky pohybovat volně skrz kutikulu.

4.3. Sekrece komponentů buněčné stěny

Ukládání materiálů buněčné stěny rostlin je úzce spjaté s cytoskeletem. Kortikální mikrotubuly se v rostoucích buňkách ukládají kolmo ke směru růstu na vnitřní straně plazmatické membrány paralelně s mikrofibrily celulózy na straně druhé (Baskin *et al.*, 2004). Polymerní vlákna celulózy jsou syntetizována komplexem celuloza syntázy, který je asociovaný s plazmatickou membránou (Crowell *et al.*, 2009). Tyto komplexy jsou tam dopravovány sekretorickou drahou za účasti cytoskeletu a Golgiho aparátu (Crowell *et al.*, 2009). Vztah mezi uspořádanými kortikálními mikrotubuly a mikrofibrilami celulózy nebyl dosud plně objasněn. Podle jedné hypotézy kortikální mikrotubuly řídí ukládání celulózních mikrofibril tím, že fungují jako kolejnice pro celulóza syntázu, určují její trajektorii, a tím ovládají ukládání celulózy v buněčné stěně (Hasezawa & Nozaki, 1999; Ehrhardt & Shaw, 2006)). Ovšem některá pozorování této hypotézy odporují. Například experimenty, které demonstrovaly, že nepřítomnost organizovaných kortikálních mikrotubulů nemusí vždy porušit paralelní orientaci celulózových mikrofibril (Himmelsbach *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2003).

Na rozdíl od celulózy a kalózy, které jsou syntetizovány komplexy asociovanými s plazmatickou membránou, je polysacharidová matrix syntetizována v Golgiho aparátu a pomocí váčků sekretorické dráhy je dopravována k plazmatické membráně (Sandhu *et al.*, 2009). Polysacharidy matrix vytváří velké množství různých glykosidických vazeb a liší se mezi sebou svými cukernými zbytky (Sandhu *et al.*, 2009). Poté, co jsou sekretovány do buněčné

stěny mezi sebou začnou vytvářet vazby a vázat se k mikrofibrilám celulózy, čímž vytvoří pevnou, ale zároveň pružnou síť (Sandhu *et al.*, 2009). Stejně jako pektiny jsou v Golgiho aparátu syntetizovány i hemicelulózy, které jsou následně do buněčné stěny transportovány pomocí váčků (Wulff *et al.*, 2000).

4.4. Polarizovaná sekrece při vzniku trichomů

Buňky trichomů v průběhu své morfogeneze vyrostou v porovnání s ostatními epidermálními buněčnými typy do velice komplikovaného tvaru. Po endoreduplikační fázi a po fázi větvení proběhne fáze polarizovaného růstu nově iniciovaných větví do délky (Schellmann & Hulskamp, 2005). V této prodlužovací fázi nedochází k apikálnímu růstu, jak by se mohlo zdát, nýbrž se jednotlivé větve trichomu prodlužují polarizovaným difusním růstem (Schellmann & Hulskamp, 2005). Klíčovou roli v tomto procesu hraje komplex ARP2/3, který tvorbou nových aktinových vláken na vláknech již existujících vytváří rozptýlenou F-aktinovou síť (Mullins *et al.*, 1998).

Skupina osmi mutantů nazvaná „*distorted*“ se v trichomech projevuje společným fenotypem, kdy není narušena ani endoreduplikační ani větvicí fáze, nýbrž právě fáze prodlužovací. Po dokončení větvení se jednotlivé větve neprodužují a namísto toho rostou náhodně do všech směrů, nebo se pokrčují, anebo dokonce nerostou vůbec (Schwab *et al.*, 2003). Čtyři geny ze skupiny *distorted* přímo kódují podjednotky ARP2/3 komplexu (Li *et al.*, 2003; Saedler *et al.*, 2004; Mathur *et al.*, 2003a; Mathur *et al.*, 2003b). Funkce aktinu v těchto mutantech není globálně poškozena, jak dokazují pozorování peroxisomů a Golgiho aparátu pohybujících se podél aktinového cytoskeletu (Schellmann & Hulskamp, 2005). Zdravé trichomy obsahují náhodně orientovaná jemná vlákna aktinu v cytoplazmě a rozptýlený kortikální F-aktin v rostoucích větvích a ve stopce (Li *et al.*, 2003). V mutantních rostlinách se objevují četné poruchy aktinového cytoskeletu. Kortikální F-aktin a jemná aktinová vlákna jsou v deformovaných stoncích nebo zakrňelých větvích redukována a místo nich se často objevují tlusté aktinové svazky (Schellmann & Hulskamp, 2005).

Tvarování trichomů závisí na ukládání a přebudování buněčné stěny a hlavně na prostorovém rozmístění těchto procesů. V dlaždicových buňkách ARP2/3 komplex vytváří rozptýlený F-aktin v lalocích, díky kterému se do těchto zón aktivního polarizovaného růstu dopravuje materiál buněčné stěny a plazmatické membrány pomocí post-Golgi váčků (Fu *et*

al., 2002a). V průběhu formování větví trichomů se ve špičce také nachází rozptýlený F-aktin a naopak v nerostoucích mutantních větvích je tato složka cytoskeletu redukována (Schellmann & Hulskamp, 2005). Polarizovaná sekrece v trichomech je tedy závislá na správně vytvořeném cytoskeletu. A díky ní mohou plazmatická membrána a buněčná stěna přirůstat právě jen ve špičce větve trichomu a prodlužovat ji v jednom směru.

4.5. Polarizovaná sekrece při vývoji semenných obalů

Epidermis vnějšího vaječného integumentu semene *Arabidopsis thaliana* se po oplození diferencuje ve specializované sekreční buňky, které během krátké, nicméně intenzivní sekreční periody vyprodukují velké množství slizu. Sliz, jehož hlavní složkou je pektin, se ukládá mezi plazmatickou membránou a primární buněčnou stěnou (Beeckman *et al.*, 200; Western *et al.*, 2000; Windsor *et al.*, 2000). Polysacharidové molekuly se z Golgiho aparátu dostávají k plazmatické membráně sekretorickou drahou a následně jsou exocytovány do extracelulární matrix (Dupree & Sherrier, 1998). Morfologie epidermálních buněk semenného obalu je značně charakteristická. Ve středu buněk se nachází sekundární buněčná stěna ve tvaru kužele vyplněná cytoplazmou (Western *et al.*, 2000). Tento útvar zvaný kolumela je obklopen slizovou kapsou ve tvaru prstence. Umístění suchých semen do vodnatého prostředí, způsobí hydrataci slizového prstence, který následně expanduje, protrhne primární buněčnou stěnu a obalí semeno. Pro diferenciaci slizových buněk povrchu semene je důležitá regulace jejich morfogeneze a růstu, biosyntéza a sekrece slizu a sekundární buněčné stěny (Windsor *et al.*, 2000).

Obrovské množství slizu se během krátké doby polarizovaně sekretuje k apikální doméně plazmatické membrány a akumuluje se pod primární buněčnou stěnou na povrchu semene okolo kolumely. Bohužel dosud nebyli identifikováni žádní mutanti sekretorické dráhy při vývoji epidermálních buněk semene *Arabidopsis thaliana*. V oblasti této sekreční domény bylo pozorováno zvýšené množství kortikálních mikrotubulů oproti basolaterálním oblastem kortikální cytoplazmy, kde jich bylo jen málo (McFarlane *et al.*, 2008). Aktinová mikrofilamenta byla rozmístěna v buňce rovnoměrně a ani v oblasti apikální domény plazmatické membrány nevykazovala odlišnou koncentraci. Hypotéza, že je vysoká koncentrace kortikálních mikrotubulů u sekreční apikální domény důležitá pro polarizaci sekrece nebyla potvrzena. U teplotně sensitivních mutantů *mor1-1*, jejichž mikrotubuly při

teplotě 29 °C pozbývají uspořádání, nedošlo k porušení cílené sekrece slizu do slizové kapsy, ani jejich tvaru či ukládání sekundární buněčné stěny (McFarlane *et al.*, 2008). To, že mikrotubuly nejsou pro sekreci slizu přímo důležité, bylo demonstrováno i na buňkách kořenové čepičky, kde inhibitory aktinových mikrofilament snížily produkci slizu, zatímco inhibitory mikrotubulů produkci slizu neovlivnily (Brandizzi *et al.*, 2003).

Zahájení biosyntézy slizu koreluje se zvýšením počtu cisteren Golgiho aparátu v buňce. Prostorové rozmístění cisteren v cytoplazmě je náhodné a nedochází k žádné polarizaci, či shlukování v blízkosti místa sekrece (Young *et al.*, 2008). Splynutí post-Golgi váčku s plazmatickou membránou předchází navázání váčku ke konkrétnímu místu na membráně. Pro tento proces jsou důležité proteiny SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptors), Rab proteiny, malé GTPázy rodiny ROP a tethering komplexy (Whyte & Munro, 2002). Právě poslední jmenovaná součást, tethering komplex, který zprostředkovává docking sekretorických váčků k cílové membráně, jak se zdá, hraje v procesu exocytózy hlavní roli (Whyte & Munro, 2002). Tetheringu se účastní i komplex exocyst, efektor malých GTPáz, který tak podporuje polarizovanou sekreci slizu. Dvě podjednotky komplexu exocyst (SEC8 a EXO70A1) se společně s nově objeveným interaktorem jedné z nich (ROH1) účastní polarizovaného vývoje sekretorických buněk epidermis semenných obalů (Kulich *et al.*, 2010). Oba mutanti, *sec8* a *exo70A1*, se projevovali sníženou sekrecí slizu na povrch a špatně formovanou kolumelou. Ztenčení slizové vrstvy u mutanta *exo70A1* nebylo zdaleka tak výrazné jako u mutanta *sec8*, kde zůstalo opravdu jen nepatrné množství slizu. To je způsobeno pravděpodobně funkční redundancí jednotky EXO70A1 s jejími četnými paralogy (Kulich *et al.*, 2010). Díky vlastnostem svého vývoje se buňky epidermis semene *Arabidopsis thaliana* jeví jako vhodný modelový systém pro studium polarizované sekrece a role komplexu exocyst při ní.

5. Závěr

Buněčná polarizace má nepostradatelný význam v životě rostliny, v průběhu jejího vývoje, růstu a soužití s okolním světem. Studium na modelových systémech jako jsou pylové láčky, kořenové vlásky, trichomy a dlaždicové buňky epidermis přináší mnoho nových poznatků o signalizačních drahách a sítích, které regulují buněčnou polaritu. Přesto zůstává velký prostor pro další bádání a objevování dosud nevyjasněných článků mozaiky. Nejasný je polarizovaný transport kutikulárních vosků a obzvláště kutinu samotného. Mnoho nevyjasněného zůstává i v signalizační síti ROP GTPáz, kde je potřeba identifikovat další efektorové proteiny a vztahy mezi nimi. Role cytoskeletu v těchto procesech se již začíná poměrně jasně rýsovat, nicméně konkrétní molekulární mechanismy často vůbec známe nejsou.

Použitá literatura

- Baskin TI, Beemster GT, Judy-March JE, Marga F. 2004.** Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **135**: 2279-2290.
- Beeckman T, De Rycke R, Viane R, Inzé D. 2000.** Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* **113**, 139–148.
- Berger D, Altmann T. 2000.** A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* **14**: 1119-1131.
- Bhat RA, Panstruga R. 2005.** Lipid rafts in plants. *Planta* **223**: 5-19.
- Bichet A, Desnos T, Turner S, Grandjean O, Hofte H. 2001.** BOTERO1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant J.* **25**: 137-148.
- Bird D, Beisson F, Brigham A, Shin J, Greer S, Jetter R, Kunst L, Wu X, Yephremov A, Samuels L. 2007.** Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J.* **52**: 485-498.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P. 2005.** Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104-116.
- Bouquin T, Mattsson O, Naested H, Foster R, Mundy J. 2003.** The *Arabidopsis* lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *Journal of Cell Science* **116**: 791-801.
- Brandizzi F, Saint-Jore C, Moore I, Hawes C. 2003.** The relationship between endomembranes and the plant cytoskeleton. *Cell Biol.Int.* **27**: 177-179.
- Brennwald P, Rossi G. 2007.** Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS Lett.* **581**: 2119-2124.
- Burk DH, Liu B, Zhong R, Morrison WH, Ye ZH. 2001.** A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**: 807-827.
- Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O, Bouchez D. 2002.** The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**: 833-845.
- Carol RJ, Takeda S, Linstead P, Durrant MC, Kakesova H, Derbyshire P, Drea S, Zarsky V, Dolan L. 2005.** A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* **438**: 1013-1016.
- Carpita N, Tierney M, Campbell M. 2001.** Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol.Biol.* **47**: 1-5.
- Craig S, Staehelin LA. 1988.** High pressure freezing of intact plant tissues. Evaluation and characterization of novel features of the endoplasmic reticulum and associated membrane systems. *Eur.J.Cell Biol.* **46**: 81-93.
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof YD, Schumacher K, Gonneau M, Hofte H, Vernhettes S. 2009.** Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 1141-1154.
- De VL, Beeckman T, Beemster GT, Krols L, Terras F, Landrieu I, van der SE, Maes S, Naudts M, Inzé D. 2001.** Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1653-1668.

- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JM, Jacqmard A, Kilby NJ, Murray JA. 2003.** Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79-92.
- Dickson CH, Preece TF. 1976.** Microbiology of Aerial Plant Surfaces. Academic Press, London.
- Doblin MS, Pettolino F, Bacic A. 2010.** Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology* **37**: 357-381.
- Dong J, MacAlister CA, Bergmann DC. 2009.** BASL controls asymmetric cell division in Arabidopsis. *Cell* **137**: 1320-1330.
- Dupree P, Sherrier DJ. 1998.** The plant Golgi apparatus. *Biochim.Biophys.Acta* **1404**: 259-270.
- Ehrhardt DW, Shaw SL. 2006.** Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annu.Rev.Plant Biol.* **57**: 859-875.
- Folkers U, Berger J, Hulskamp M. 1997.** Cell morphogenesis of trichomes in Arabidopsis: differential control of primary and secondary branching by branch initiation regulators and cell growth. *Development* **124**: 3779-3786.
- Folkers U, Kirik V, Schobinger U, Falk S, Krishnakumar S, Pollock MA, Oppenheimer DG, Day I, Reddy AS, Jurgens G, Hulskamp M. 2002.** The cell morphogenesis gene ANGUSTIFOLIA encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton. *EMBO J.* **21**: 1280-1288.
- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z. 2005.** Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* **120**: 687-700.
- Fu Y, Li H, Yang Z. 2002.** The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *Plant Cell* **14**: 777-794.
- Fu Y, Xu T, Zhu L, Wen M, Yang Z. 2009.** A ROP GTPase signaling pathway controls cortical microtubule ordering and cell expansion in Arabidopsis. *Curr.Biol.* **19**: 1827-1832.
- Geisler M, Nadeau J, Sack FD. 2000.** Oriented asymmetric divisions that generate the stomatal spacing pattern in arabidopsis are disrupted by the too many mouths mutation. *Plant Cell* **12**: 2075-2086.
- Geisler MJ, Deppong DO, Nadeau JA, Sack FD. 2003.** Stomatal neighbor cell polarity and division in Arabidopsis. *Planta* **216**: 571-579.
- Gincel E, Simorre JP, Caille A, Marion D, Ptak M, Vovelle F. 1994.** Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers. *Eur.J.Biochem.* **226**: 413-422.
- Grabski S, de Feijter AW, Schindler M. 1993.** Endoplasmic Reticulum Forms a Dynamic Continuum for Lipid Diffusion between Contiguous Soybean Root Cells. *Plant Cell* **5**: 25-38.
- Gray JE, Holroyd GH, van der Lee FM, Bahrami AR, Sijmons PC, Woodward FI, Schuch W, Hetherington AM. 2000.** The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development. *Nature* **408**: 713-716.
- Gu Y, Li S, Lord EM, Yang Z. 2006.** Members of a novel class of Arabidopsis Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth. *Plant Cell* **18**: 366-381.
- Hasezawa S, Nozaki H. 1999.** Role of cortical microtubules in the orientation of cellulose microfibril deposition in higher-plant cells. *Protoplasma* **209**: 98-104.
- Himmelspach R, Williamson RE, Wasteneys GO. 2003.** Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganization. *Plant J.* **36**: 565-575.
- Hulskamp M, Schnittger A, Folkers U. 1999.** Pattern formation and cell differentiation: trichomes in Arabidopsis as a genetic model system. *Int.Rev.Cytol.* **186**: 147-178.

- Hwang I, Robinson DG. 2009.** Transport vesicle formation in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 660-669.
- Chen X, Goodwin SM, Boroff VL, Liu X, Jenks MA. 2003.** Cloning and characterization of the WAX2 gene of Arabidopsis involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* **15**: 1170-1185.
- Jones MA, Shen JJ, Fu Y, Li H, Yang Z, Grierson CS. 2002.** The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell* **14**: 763-776.
- Keresztessy Z, Hughes MA. 1998.** Homology modelling and molecular dynamics aided analysis of ligand complexes demonstrates functional properties of lipid-transfer proteins encoded by the barley low-temperature-inducible gene family, blt4. *Plant J.* **14**: 523-533.
- Kerstens S, Decraemer WF, Verbelen JP. 2001.** Cell walls at the plant surface behave mechanically like fiber-reinforced composite materials. *Plant Physiol* **127**: 381-385.
- Kirik V, Grini PE, Mathur J, Klinkhammer I, Adler K, Bechtold N, Herzog M, Bonneville JM, Hulskamp M. 2002a.** The Arabidopsis TUBULIN-FOLDING COFACTOR A gene is involved in the control of the alpha/beta-tubulin monomer balance. *Plant Cell* **14**: 2265-2276.
- Kirik V, Mathur J, Grini PE, Klinkhammer I, Adler K, Bechtold N, Herzog M, Bonneville JM, Hulskamp M. 2002b.** Functional analysis of the tubulin-folding cofactor C in Arabidopsis thaliana. *Curr.Biol.* **12**: 1519-1523.
- Kulich I, Cole R, Drdova E, Cvrckova F, Soukup A, Fowler J, Zarsky V. 2010a.** Arabidopsis exocyst subunits SEC8 and EXO70A1 and exocyst interactor ROH1 are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytol.*
- Kunst L, Samuels AL. 2003.** Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog.Lipid Res.* **42**: 51-80.
- Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bar S, Voisin D, Efremova N, Franke R, Schreiber L, Saedler H, Metraux JP, Yephremov A. 2006a.** The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 321-339.
- Kurdyukov S, Faust A, Trenkamp S, Bar S, Franke R, Efremova N, Tietjen K, Schreiber L, Saedler H, Yephremov A. 2006b.** Genetic and biochemical evidence for involvement of HOTHEAD in the biosynthesis of long-chain alpha-,omega-dicarboxylic fatty acids and formation of extracellular matrix. *Planta* **224**: 315-329.
- Lai LB, Nadeau JA, Lucas J, Lee EK, Nakagawa T, Zhao L, Geisler M, Sack FD. 2005.** The Arabidopsis R2R3 MYB proteins FOUR LIPS and MYB88 restrict divisions late in the stomatal cell lineage. *Plant Cell* **17**: 2754-2767.
- Larkin JC, Brown ML, Schiefelbein J. 2003.** How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in Arabidopsis. *Annu.Rev.Plant Biol.* **54**: 403-430.
- Larkin JC, Oppenheimer DG, Lloyd AM, Paparozzi ET, Marks MD. 1994.** Roles of the GLABROUS1 and TRANSPARENT TESTA GLABRA Genes in Arabidopsis Trichome Development. *Plant Cell* **6**: 1065-1076.
- Lavy M, Bloch D, Hazak O, Gutman I, Poraty L, Sorek N, Sternberg H, Yalovsky S. 2007.** A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr.Biol.* **17**: 947-952.
- Li H, Wu G, Ware D, Davis KR, Yang Z. 1998.** Arabidopsis Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast. *Plant Physiol* **118**: 407-417.
- Li S, Blanchoin L, Yang Z, Lord EM. 2003.** The putative Arabidopsis arp2/3 complex controls leaf cell morphogenesis. *Plant Physiol* **132**: 2034-2044.

- Lolle SJ, Hsu W, Pruitt RE. 1998.** Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 607-619.
- Lolle SJ, Cheung AY, Sussex IM. 1992.** Fiddlehead: an *Arabidopsis* mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interactions between epidermal cells. *Dev.Biol.* **152**: 383-392.
- Lucas JR, Nadeau JA, Sack FD. 2006.** Microtubule arrays and *Arabidopsis* stomatal development. *J.Exp.Bot.* **57**: 71-79.
- Mathur J, Chua NH. 2000.** Microtubule stabilization leads to growth reorientation in *Arabidopsis* trichomes. *Plant Cell* **12**: 465-477.
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Hulskamp M. 2003a.** Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1632-1645.
- Mathur J, Mathur N, Kirik V, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M. 2003b.** *Arabidopsis* CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development* **130**: 3137-3146.
- McFarlane HE, Young RE, Wasteneys GO, Samuels AL. 2008.** Cortical microtubules mark the mucilage secretion domain of the plasma membrane in *Arabidopsis* seed coat cells. *Planta* **227**: 1363-1375.
- Melaragno JE, Mehrotra B, Coleman AW. 1993.** Relationship between Endopolyploidy and Cell Size in Epidermal Tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 1661-1668.
- Merk S, Blume A, Rieder M. 1998.** Phase behaviour and crystallinity of plant cuticular waxes studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Planta* **204**: 44-53.
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C. 1998.** Lipid trafficking in plant cells. *Prog.Lipid Res.* **37**: 371-391.
- Müller C, Riederer M. 2005.** Plant Surface Properties in Chemical Ecology. *Journal of Chemical Ecology* **31**: 2621-2651.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998.** The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 6181-6186.
- Nadeau JA, Sack FD. 2002.** Control of stomatal distribution on the *Arabidopsis* leaf surface. *Science* **296**: 1697-1700.
- Nadeau JA, Sack FD. 2003.** Stomatal development: cross talk puts mouths in place. *Trends Plant Sci.* **8**: 294-299.
- Oppenheimer DG, Pollock MA, Vacik J, Szymanski DB, Ericson B, Feldmann K, Marks MD. 1997.** Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 6261-6266.
- Panikashvili D, Aharoni A. 2008.** ABC-type transporters and cuticle assembly: Linking function to polarity in epidermis cells. *Plant Signal.Behav.* **3**: 806-809.
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Hofer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A. 2007.** The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol* **145**: 1345-1360.
- Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL. 2004.** Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704.
- Preuss D, Lemieux B, Yen G, Davis RW. 1993.** A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes Dev.* **7**: 974-985.

- Pyee J, Yu H, Kolattukudy PE. 1994.** Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch.Biochem.Biophys.* **311**: 460-468.
- Qiu JL, Jilk R, Marks MD, Szymanski DB. 2002.** The Arabidopsis SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *Plant Cell* **14**: 101-118.
- Ramsay NA, Glover BJ. 2005.** MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci.* **10**: 63-70.
- Rea PA. 2007.** Plant ATP-Binding cassette transporters. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 347-375.
- Saedler R, Mathur N, Srinivas BP, Kernebeck B, Hulskamp M, Mathur J. 2004.** Actin control over microtubules suggested by DISTORTED2 encoding the Arabidopsis ARPC2 subunit homolog. *Plant Cell Physiol* **45**: 813-822.
- Sachetto-Martins G, Franco LO, de Oliveira DE. 2000.** Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim.Biophys.Acta* **1492**: 1-14.
- Saibo NJ, Vriezen WH, Beemster GT, Van der SD. 2003.** Growth and stomata development of Arabidopsis hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant J.* **33**: 989-1000.
- Samuels L, DeBono A, Lam P, Wen M, Jetter R, Kunst L. 2008.** Use of Arabidopsis eceriferum mutants to explore plant cuticle biosynthesis. *J.Vis.Exp.*
- Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2008.** Sealing Plant Surfaces: CuticularWax Formation by Epidermal Cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 683–707.
- Sandhu AP, Randhawa GS, Dhugga KS. 2009.** Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Mol.Plant* **2**: 840-850.
- Santrucek J, Kveton J, Setlik J, Bulickova L. 2007.** Spatial variation of deuterium enrichment in bulk water of snowgum leaves. *Plant Physiol* **143**: 88-97.
- Serna L, Fenoll C. 2002.** Reinforcing the idea of signalling in the stomatal pathway. *Trends Genet.* **18**: 597-600.
- Settleman J. 2005.** Intercalating Arabidopsis leaf cells: a jigsaw puzzle of lobes, necks, ROPs, and RICs. *Cell* **120**: 570-572.
- Schellmann S, Hulskamp M. 2005.** Epidermal differentiation: trichomes in Arabidopsis as a model system. *Int.J.Dev.Biol.* **49**: 579-584.
- Schnittger A, Hulskamp M. 2002.** Trichome morphogenesis: a cell-cycle perspective. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **357**: 823-826.
- Schulz B, Frommer WB. 2004.** Plant biology. A plant ABC transporter takes the lotus seat. *Science* **306**: 622-625.
- Schulz B, Kolukisaoglu HU. 2006.** Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett.* **580**: 1010-1016.
- Schwab B, Mathur J, Saedler R, Schwarz H, Frey B, Scheidegger C, Hulskamp M. 2003.** Regulation of cell expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: actin controls the spatial organization of microtubules. *Mol.Genet.Genomics* **269**: 350-360.
- Sieberer BJ, Ketelaar T, Esseling JJ, Emons AM. 2005.** Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytol.* **167**: 711-719.
- Sugimoto K, Himmelsbach R, Williamson RE, Wasteneys GO. 2003.** Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in Arabidopsis root cells. *Plant Cell* **15**: 1414-1429.
- Sugiyama A, Shitan N, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Yazaki K. 2006.** Genome-wide analysis of ATP-binding cassette (ABC) proteins in a model legume plant, Lotus japonicus: comparison with Arabidopsis ABC protein family. *DNA Res.* **13**: 205-228.

- Suh MC, Samuels AL, Jetter R, Kunst L, Pollard M, Ohlrogge J, Beisson F. 2005.** Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis. *Plant Physiol* **139**: 1649-1665.
- Sztul E, Lupashin V. 2006.** Role of tethering factors in secretory membrane traffic. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C11-C26.
- Szymkowiak EJ, Sussex IM. 1996.** WHAT CHIMERAS CAN TELL US ABOUT PLANT DEVELOPMENT. *Annu.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **47**: 351-376.
- ten Hove CA, Heidstra R. 2008.** Who begets whom? Plant cell fate determination by asymmetric cell division. *Curr.Opin.Plant Biol.* **11**: 34-41.
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E. 2003a.** Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol* **131**: 1191-1208.
- Webb M, Jouannic S, Foreman J, Linstead P, Dolan L. 2002.** Cell specification in the Arabidopsis root epidermis requires the activity of ECTOPIC ROOT HAIR 3--a katanin-p60 protein. *Development* **129**: 123-131.
- Western TL, Skinner DJ, Haughn GW. 2000.** Differentiation of mucilage secretory cells of the Arabidopsis seed coat. *Plant Physiol* **122**: 345-356.
- Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteneys GO. 2001.** MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* **411**: 610-613.
- Whyte JR, Munro S. 2002.** Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J.Cell Sci.* **115**: 2627-2637.
- Windsor JB, Symonds VV, Mendenhall J, Lloyd AL. 2000.** Arabidopsis seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *The Plant Journal* **22**, 483-493.
- Wu G, Gu Y, Li S, Yang Z. 2001.** A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* **13**: 2841-2856.
- Wulff C, Norambuena L, Orellana A. 2000.** GDP-fucose uptake into the Golgi apparatus during xyloglucan biosynthesis requires the activity of a transporter-like protein other than the UDP-glucose transporter. *Plant Physiol* **122**: 867-877.
- Yang Z. 2008.** Cell polarity signaling in Arabidopsis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **24**: 551-575.
- Yazaki K. 2006.** ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett.* **580**: 1183-1191.
- Young RE, McFarlane HE, Hahn MG, Western TL, Haughn GW, Samuels AL. 2008.** Analysis of the Golgi apparatus in Arabidopsis seed coat cells during polarized secretion of pectin-rich mucilage. *Plant Cell* **20**: 1623-1638.
- Zachowski A, Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC. 1998.** Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein. *Eur.J.Biochem.* **257**: 443-448.
- Zajac A, Sun X, Zhang J, Guo W. 2005.** Cyclical regulation of the exocyst and cell polarity determinants for polarized cell growth. *Mol.Biol.Cell* **16**: 1500-1512.